54-1

Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

ARMIN KAFFKA
aus Ostercappeln

Hamburg 1960

Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Armin Kaffka
aus Ostercappeln

Hamburg
1960

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

auf Antrag von Professor Dr. H. Engel

Hamburg, den 20. Juli 1960 Professor Dr. Otremba
Dekan

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhalt

A. Einleitung

B. Material und Methodik

C. Versuche und Ergebnisse

1. Beobachtungen über Zellverklumpungen bei H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e
2. Substratoxydation bei unterschiedlichem pH-Wert
3. Substratoxydation bei unterschiedlicher Substratkonzentration
4. Substratoxydation bei unterschiedlichem CO_2-Partialdruck
5. Substratabbau bei verschiedener N-Quelle
6. Endogene Atmung
7. RQ-Werte bei Oxydation von Methanol, Äthanol und Acetat
8. Oxydative Assimilation und Energetik
9. Substratoxydation mit Methylenblau
10. Oxydation von Substanzen des Tricarbonsäurecyclus
11. Die Wirkung von Enzym-Hemmstoffen

a) 2,4-Dinitrophenol
b) Natriumazid
c) Kaliumcyanid

12. Die Wirkung von Hemmstoffen des Tricarbonsäurecyclus

a) Natriumfluoressigsäure
b) Natriumarsenit
c) Natriummalonat und Diaethylmalonat

13. Einbau von C^{14} aus Acetat, Formiat und CO_2

D. Schlußbetrachtungen

E. Zusammenfassung

F. Literatur

A. Einleitung

Kulturelle und stoffwechselphysiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Hyphomicrobium vulgare verschiedenartige Substrate wie Methanol, Formaldehyd, Formiat, Äthanol, Acetat, Oxalat, Glycerin u.a.m. als Energie- und C-Quelle benutzen kann (Stutzer und Hartleb 1898; Kingma Boltjes 1936; Engel und Mevius jr. 1951; Mevius jr. 1953; Näveke und Engel 1955). Es wächst sowohl auf festen peptonhaltigen Nährböden (Kingma Boltjes 1936) als auch in rein mineralischer Nährlösung mit Nitrat als N-Quelle und einer einzigen einfachen organischen Substanz als C-Quelle. Wegen seiner Fähigkeit, selbst C_1-Körper wie Methanol und Formiat gut zu verwerten und zu CO_2 und H_2O abzubauen, scheint H. vulgare den chemo-autotrophen Mikroorganismen nahezustehen, zumal es bei niedrigem CO_2-Partialdruck nicht wächst (Mevius jr. 1953) und CO_2 in beträchtlichem Maße zum Zellaufbau verwendet (Mevius jr. 1953; Näveke 1957).

Ob jedoch das gesamte dargebotene Substrat abgebaut wird und der gesamte Zell-C aus CO_2 stammt und damit eine weitgehende Chemo-Autotrophie vorliegt, ließ sich durch die bisherigen Untersuchungsbefunde nicht entscheiden (Näveke 1957). Die Beantwortung dieser Frage dürfte - auch wenn man sich der Tracer-Technik bedient - ein sehr schwieriges Problem sein, da das energieliefernde Substrat eine organische C-Verbindung ist. Einfacher könnten sich Anhaltspunkte für eine heterotrophe Lebensweise erhalten lassen. Um daher weitere Einblicke in die stoffwechselphysiologischen Vorgänge von H. vulgare zu bekommen, wurde in vorliegender Arbeit der Ab- und Einbau der beiden C_2-Körper Äthanol und Acetat sowie des C_1-Körpers Methanol untersucht.

B. Material und Methodik

1. Anzucht von Hyphomicrobium vulgare

Die Versuche wurden mit dem von Mevius jr. isolierten Hyphomicrobium-Stamm B durchgeführt, den auch Näveke für seine Untersuchungen über den Formiatabbau verwandt hat.

Zur Anzucht diente als Basalmedium eine mineralische Lösung, der als jeweils einzige C-Quelle Methanol, Äthanol oder Acetat zugesetzt und die nach folgender Vorschrift hergestellt wurde: KNO_3 1,0 g, Na_2HPO_4 1,0 g, NaCl 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,01 g, $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ 0,001 g, Leitungswasser 1000 ml.

Diese Lösung wurde 15 Min. bei 120°C, 1 atü, sterilisiert. Hierbei bildete sich ein Niederschlag, der sofort heiß abfiltriert wurde. Nach dem Erkalten wurde 0,5% Methanol, 0,5% Äthanol oder 0,1% Na-Acetat zugesetzt und der pH-Wert mit 2n NaOH auf 7,2-7,4 gebracht. Die so zubereitete Lösung wurde zu etwa 100 ml in 200 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt, die nochmals 15 Min. bei 120°C, 1 atü, erhitzt wurden und dann gebrauchsfertig waren. Auch nach dem zweiten Sterilisieren zeigte sich ein Niederschlag, der sich aber beim Erkalten völlig oder bis auf einen geringfügigen Rest wieder auflöste. Die Beimpfung der Nährlösungen erfolgte mit 14 bis 21 Tage alten Kulturen entsprechenden Substrates, die Bebrütung bei 30°C.

4-6 Tage nach der Beimpfung zeigt sich auf der Nährbodenoberfläche eine zunächst nur schwer erkennbare zarte Haut von H.-Zellen, die sich in den folgenden Tagen ausbreitet und dichter wird, bis sie nach 10-12 Tagen als gut sichtbare Membran die ganze Oberfläche bedeckt. Diese Membran nimmt im weiteren Wachstumsverlauf an Dicke zu und kann schließlich - insbesondere bei den Acetatkulturen - so fest werden, daß sie selbst durch kräftiges Schütteln nur noch in kompakte, mehr oder weniger große Schollen zerfällt. Das Wachstum beschränkt sich aber nicht nur auf die Nährbodenoberfläche, sondern die H.-Zellen überziehen auch den Boden

und die Seitenwände der Kulturgefäße mit einem fest anhaftenden Belag.

Trotz der gleichen Ausgangslösung ist mit den einzelnen C-Verbindungen die Wachstumsgeschwindigkeit verschieden. Das beste Nährsubstrat stellt ohne Zweifel Methanol dar; dann folgt Acetat, während das Wachstum mit Äthanol im Vergleich dazu deutlich vermindert ist. Wenn man den pH-Wert der Kulturen prüft, stellt man in den Methanolkulturen gewöhnlich einen geringen Anstieg von pH 7,4 bis auf 7,8 fest. In den Acetatkulturen erfolgt dagegen, vor allem nach längerer Wachstumsdauer (18 Tage und mehr) eine deutliche Zunahme bis auf 8,0 - 8,4. Das verminderte Wachstum in den Äthanolkolben findet eine Erklärung durch das Absinken des pH-Wertes. Je nach Wachstumsdauer sank der pH-Wert von anfänglich 7,2 - 7,4 auf 6,8 - 6,2 ab. Dieses äußert sich nicht nur in verzögertem Wachstum, sondern wirkt sich auch auf die Struktur der Oberflächenmembran aus, die nicht die Festigkeit der in Methanol- und Acetatkulturen sich bildenden Kahmhaut erlängt, sondern die sich durch Schütteln mühelos gleichmäßig zerteilen läßt.

2. Herstellung der Zellsuspensionen

Hierzu wurden gut bewachsene Kulturen benutzt, deren Alter im allgemeinen 14 Tage betrug. Die Kulturkolben wurden leicht rotierend hin- und hergeschwenkt, bis sich die oberflächliche Haut zerteilt und weniger fest haftende Zellverbände von der Glaswand abgelöst hatten. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurden in die Kolben mit stark bewachsenen Glaswandungen Glasperlen gegeben, die bei kreisförmiger Bewegung der Kolben ein Loslösen der anhaftenden Zellverbände bewirkten. Die Zellen wurden bei 1500 · g 3 Min. abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen je nach Anzahl der zu beschickenden Versuchsgefäße in 40-60 ml Basalmedium oder einer anderen Versuchslösung aufgenommen. Die Suspension wurde dann in eine Weithalsflasche mit Glasstopfen gegeben und kräftig geschüttelt, um eine möglichst homogene Zerteilung zu bekommen. Waren jedoch in der Zellaufschwemmung größere Partikel oder gar

Teile der Oberflächenmembran enthalten, die sich nicht zerschütteln liessen, wurde sie durch sterile Glaswolle filtriert. Hierdurch wurden alle größeren Zellaggregate zurückgehalten, so daß eine homogen erscheinende Suspension entstand. Dies alles wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Für alle manometrischen Versuche wurden intakte Zellen verwendet.

3. Bestimmung der Zellmenge

Zur Ermittlung der Zellkonzentration, ausgedrückt in mg Trockengewicht pro ml Versuchsflüssigkeit, wurde die von N ä v e k e (1957) modifizierte Biuretreaktion nach S t i c k l a n d angewandt. Die Extinktion der Farblösung wurde mit dem Photometer Eppendorf mit Hg-Lampe, Filter Hg 546 nm, Photozelle 90 s gemessen.

4. Puffer

Die benutzten Pufferlösungen dienten verschiedenen Zwecken. Der CO_2-Puffer wurde bei den Acetatversuchen als Ersatz für die sonst verwandte, im Zentralzylinder der Warburg-Gefäße befindliche KOH genommen, um den CO_2-Partialdruck konstant zu halten. Die anderen Pufferlösungen wurden der Zellsuspension zugefügt, um den pH-Wert konstant zu halten. Die Herstellung entsprach (CO_2-Puffer ausgenommen) den Angaben von R a u e n (1956).

a) CO_2-Puffer; 80 Vol. Teile 1 M $NaCO_3$ = Lösung + 20 Vol.Teile 1 M $NaHCO_3$-Lösung

b) Universalpuffer nach T h e o r e l l - S t e n h a g e n ; es wurden Pufferlösungen mit folgenden pH-Werten hergestellt: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 und 10,0

c) Trisoxymethylaminomethan/HCl-Pufferlösungen (0,05 M) mit folgenden pH-Werten: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0

d) Phosphatpuffer nach S ö r e n s e n (0,04 M) mit folgenden pH-Werten: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0.

Für die Prüfungen des O_2-Verbrauchs bei unterschiedlichem pH-Wert wurden dichte Zellsuspensionen in CO_2-freiem H_2O hergestellt, von denen 1,0 ml zu je 3,0 ml des entsprechenden Puffers in die Warburg-Gefäße gegeben wurde, so daß sich die Endkonzentration der Puffer um ein Viertel verringerte.

5. Manometrische Messungen

Der Gasumsatz wurde mit Hilfe der Warburg-Technik bestimmt. Die Messungen wurden mit einfachen, offenen Manometern durchgeführt, wenn es sich darum handelte, eine größere Anzahl Reaktionsgefäße (bis zu 12) in einem einzigen Untersuchungsgang einzusetzen. Dieses war bei den RQ-Bestimmungen der Fall. Sonst wurden Differentialmanometer benutzt. Die Temperatur des Wasserbades betrug 30°C. Die RQ-Bestimmungen wurden nach der direkten Methode von W a r b u r g vorgenommen. Die Substratkonzentration betrug für die RQ-Versuche 10mMol/l. Sie war so gewählt, daß während einer längeren Versuchsdauer (bis zu 24 Std.) mit einem merklichen Druckabfall infolge Erschöpfung oder Abnahme des auch in der Gasphase befindlichen Substrates Methanol und Äthanol nicht zu rechnen war.

Schwieriger gestalteten sich jene Versuche, die nur mit einer geringen Menge Methanol bzw. Äthanol bis zu deren völligen Verbrauch durchgeführt wurden. Hierbei störte es, daß die Alkohole auf dem Wege über die Gasphase in die Suspension gelangten und bereits Substrat oxydiert wurde, bevor das Manometer-System ins Gleichgewicht gekommen war. Dieses dauerte, wie mit abgetöteten Zellsuspensionen festgestellt wurde, im allgemeinen jedoch nicht länger als 20 Min.

Ein weiterer Fehler entstand dadurch, daß der Partialdruck der Alkohole entsprechend der Konzentrationsabnahme in der Suspension während der Oxydation bis auf den Wert Null sank. Dadurch wurde ein höherer O_2-Verbrauch vorgetäuscht als tatsächlich vorhanden war. Unter den gegebenen Bedingungen machte dieser Fehler etwa 8 µl O_2 aus, was etwa 5% des Gesamtumsatzes entsprach.

Die Flüchtigkeit der verwendeten Alkohole ließ es daher zweckmäßig erscheinen, die Versuche so anzusetzen, daß der Einfluß von Konzentration und Temperatur möglichst gering war.

Das Ansetzen der Versuche wurde folgendermaßen abgeändert: Die Mittelgefäße aller Reaktionsgefäße erhielten an Stelle von 0,5 ml 5%iger nur 0,3 ml 10%ige Kalilauge. In den Hauptraum wurden 4,0 ml Suspension + 0,7 ml Basalmedium für die Bestimmung der endogenen Atmung bzw. 4,0 ml Suspension + 0,2 ml Basalmedium + 0,5 ml Alkohollösung für die Substratoxydation gegeben, so daß die Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Warburggefäß wie bei allen anderen manometrischen Versuchen 5,0 ml und das Gesamtvolumen im Hauptraum 4,7 ml betrug. Als erstes wurden die Gefäße für die endogene Atmung beschickt und an die Manometer angeschlossen. Sodann wurden die anderen Gefäße mit den angegebenen Lösungen gefüllt, als letztes erhielten sie die Alkohollösung. Diese Gefäße wurden sofort angeschlossen und ins Wasserbad bei 30°C gebracht. Dieser Zeitpunkt galt als Versuchsbeginn. Mit dem Verschließen der Manometer wurde sogleich begonnen und die erste Ablesung 30 Minuten, die zweite 60 Minuten nach dem Einhängen ins Wasserbad vorgenommen. Für die ersten manometrisch nicht erfassten 30 Minuten wurde die gleiche O_2-Menge angerechnet, wie in den zweiten 30 Minuten verbraucht wurde. Sicherlich haben die H.-Zellen nicht sofort nach dem Einbringen der Reaktionsgefäße ins Wasserbad in gleichem Maße das Substrat oxydiert. Trotzdem dürfte die Oxydationsleistung bis zu Beginn des gemessenen O_2-Verbrauchs nicht wesentlich geringer gewesen sein, zumal die Suspension die Temperatur des Wasserbades von 30°C in kürzester Zeit erreicht und die Substratoxydation bei Zimmertemperatur während des Ansetzens der Versuche nicht berücksichtigt wurde.

Die Versuche wurden so lange durchgeführt, bis nach Substraterschöpfung der O_2-Verbrauch sich der endogenen Atmung angeglichen hatte.

6. Nachweis der Essigsäure

Die Freisetzung der Essigsäure aus Filtraten von Äthanol-Kulturen (150-200 ml) erfolgte durch Wasserdampfdestillation und ihr Nachweis papierchromatographisch. Die Versuchsmethodik wurde in Anlehnung an die Angaben von Momtaz El-Gindy und Drews (1957) durchgeführt.

7. Papierchromatographische Trennung der Aminosäuren

Hierzu wurden die H.-Zellen in zugeschmolzenen Ampullengläsern mit 6 n HCl (5 ml auf etwa 5 mg Trockengewicht) 20 Stunden bei 110°C hydrolisiert. Lösungsmittelgemische für die zweidimensionalen Chromatogramme auf Filterpapier 2043 b Mgl (Schleicher & Schüll) waren n-Butanol (9 Volumenteile, wassergesättigt)-Essigsäure (1 Volumenteil; 99%)-dest. Wasser (1 Volumenteil) in der ersten Richtung und Amylalkohol (7 Volumenteile) -Pyridin (7 Volumenteile) - dest. Wasser (6 Volumenteile) in der zweiten Richtung. Zur Lokalisierung der getrennten Aminosäuren diente das radioautographische Verfahren (Röntgenfilm Agfa SSS klar, Entwicklung nach 200 St.)

8. Substratoxydation mit Methylenblau

Für diese Versuche wurden Thunberg-Gefäße benutzt, die an Stelle des einfachen Schliffstopfens einen gebogenen Hohlstopfen hatten. Der Hauptraum wurde mit 3,0 ml dichter Zellsuspension in 0,03 M Phosphatpuffer (3-5 mg Trockengewicht Zellen) und 1,0 ml 10 mM Substratlösung beschickt. In den Hohlstopfen wurde 1,0 ml 0,5 mM Methylenblaulösung eingefüllt. Die Kontrollgefäße erhielten anstatt der Substratlösung die gleiche Menge Aq. dest. Die so beschickten Gefäße wurden mit der Wasserstrahlpumpe bis zum kurzen Aufsieden der Lösungen evakuiert und ins Wasserbad bei 30°C gebracht. Nach 15 Minuten wurde die Methylenblaulösung in die Suspension gekippt und die Zeit bis zur völligen Entfärbung bestimmt.

9. Methodisches zu den Assimilationsversuchen mit C^{14}-Acetat, -Formiat und CO_2

Wegen der Zellverflechtungen von Hyphomicrobium (s.S. 8 lassen sich Zellpräparate gleichmäßiger Schichtdicke für Radioaktivitätsbestimmungen nicht herstellen. Es war daher nötig, die Zellsubstanz zu veraschen, das entstehende CO_2 in $BaCO_3$ zu überführen und dieses zu messen. Die feuchte Veraschung wurde nach den Angaben von v a n S l y k e und F o l c h (1940) durchgeführt. Die Radioaktivität

wurde in dicker Schicht gemessen.

Als radioaktive Substanzen dienten C^{14}-markiertes Acetat (C_1- bzw. C_2-markiert), Formiat sowie CO_2. Um gut messbare Werte zu bekommen, wurde eine dichte Zellsuspension hergestellt (ca. 1000 mg/l Trockengewicht) unter Verwendung von Basalmedium, das mit CO_2-freiem H_2O angesetzt war und als N-Quelle $(NH_4)_2HPO_4$ enthielt. Zur Erleichterung der O_2-Versorgung wurden die Suspensionen in Warburg-Gefäße gefüllt und in gleicher Weise wie bei den manometrischen Untersuchungen im Wasserbad bei 30°C geschüttelt. Die Versuche wurden nach 2 bzw. 3 St. abgebrochen.

Die Messungen wurden mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49 (Eingangsempfindlichkeit = 10 mV) und dem Methandurchfluß-zähler FH 407 mit Endfenster (Hostaphanfolie) 0,9 $mg \cdot cm^{-2}$ unter Benutzung des Handprobenwechslers FH 411 (Geräte der Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck) durchgeführt.

C. Versuchsergebnisse

1. Beobachtungen über Zellverklumpungen bei Hyphomicrobium vulgare

Homogen erscheinende Zellsuspensionen von H. vulgare verändern ihr Aussehen, wenn sie den Schüttelbewegungen der Warburg-Apparatur ausgesetzt werden. Nach mehr oder weniger langer Versuchsdauer entstehen Zellverklumpungen, deren Auftreten durch die Art des Substrates, pH-Wert u.a. beeinflußt wird.

Mit Äthanol traten Zellverklumpungen schon nach 1-2 stündigem Schütteln in Erscheinung und nahmen manchmal kontinuierlich zu, bis bei Versuchsende in der klar gewordenen Suspensionsflüssigkeit nur wenige größere Zellklumpen vorhanden waren. Ihre Konsistenz war oft so fest, daß sie sich durch einfaches Schütteln nicht zerteilen ließen (Abb. 1).

Auch mit Methanol oder Acetat zeigten sich Zellanhäufungen, die aber nur selten groß und kompakt waren. Dagegen wiesen bei allen Versuchen die Suspensionen ohne Substrat zur Prüfung der endogenen Atmung die geringfügigsten Veränderungen auf (Abb. 1 u. 2).

Veränderung der Dispersität von Hyphomicrobium-Zellsuspensionen während der manometrischen Versuche

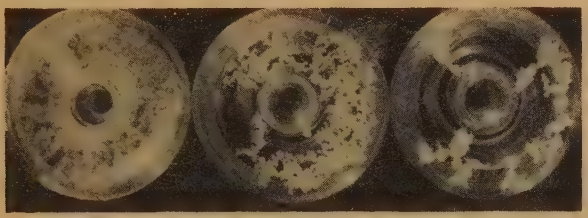


Abb. 1 Zellsuspensionen einer 14 Tage alten Äthanolkultur von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e in Warburg-Gefäßen

links: vor Versuchsbeginn
Mitte: nach 18 stündiger Versuchsdauer bei endogener Atmung
rechts: nach 18 stündiger Versuchsdauer bei Oxydation von Äthanol (10 mMol/l)

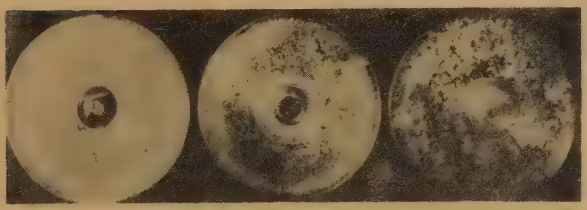


Abb. 2 Zellsuspensionen einer 14 Tage alten Acetatkultur von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e in Warburg-Gefäßen

links: vor Versuchsbeginn
Mitte: nach 23 stündiger Versuchsdauer bei endogener Atmung
rechts: nach 23 stündiger Versuchsdauer bei Oxydation von Acetat (10 mMol/l)

Am wenigsten veränderten sich die Suspensionen aus möglichst jungen, 8–10 Tage alten Kulturen. Betrug aber das Alter 20 Tage und mehr, so bildeten sich auch in den Methanol-

und Acetatkulturen starke kugelige Zellzusammenballungen (Abb. 3).

Daneben zeigte sich in älteren Suspensionen eine andere Art der Zellverklumpung. Auf der Begrenzungslinie, die von der Suspensionsflüssigkeit auf der Gefäßwand bei größter Amplitude der Schüttelbewegung gebildet wird, setzten sich Zellaggregate ab, die sich allmählich zu einem sichelförmigen Band vergrößerten. Dieses befand sich infolgedessen nicht ständig in der Nährflüssigkeit, sondern wurde von ihr nur bei jeder Schwingung benetzt. (Abb. 4).

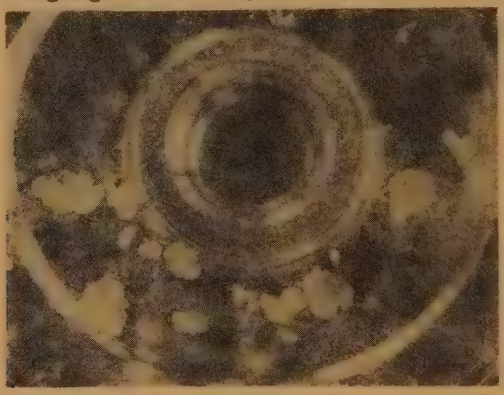


Abb. 3 Zusammenballung von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e -Zellen nach 40 stündiger Versuchsdauer bei Acetatoxydation (10 mMol/l). Alter der Kultur: 21 Tage.

Abb. 4 Der Wandung eines Warburg-Gefäßes anhaftende Zellen von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e nach 40 stündiger Versuchsdauer bei Oxydation von Acetat (10 mMol/l). Alter der Kultur: 21 Tage.

Als Folge aller dieser Erscheinungen war der Gasaustausch je nach Dichte und Größe der Zellzusammenballung mehr oder weniger stark erschwert. Das führte zu Abweichungen der Ergebnisse besonders dann, wenn in Parallelansätzen stark unterschiedliche Zellanhäufungen entstanden waren. (Abb. 5).

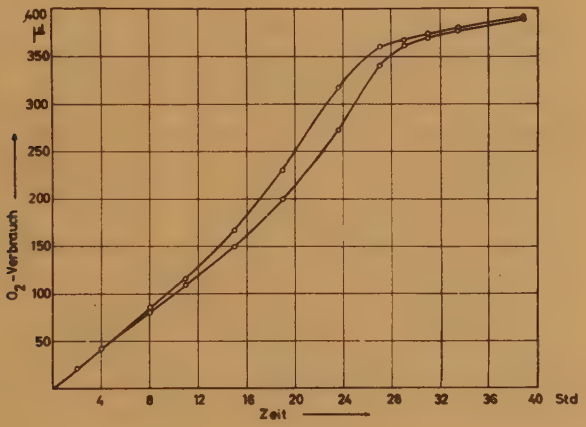


Abb. 5 Einfluß der Dispersität von Hyphomicrobium- Zellsuspensionen auf die Substratoxydation. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Substrat: Methanol (3,3 mMol/l). Zellkonzentration: 74,5 mg/l (Trockengewicht). pH = 7,5; Temp.: 30°C.

Obere Kurve: O_2-Verbrauch einer Suspension mit Flockenbildung und geringfügiger Zellverklumpung

Untere Kurve: O_2-Verbrauch einer gleichen Zellmenge mit starker Verklumpung.

Auf Grund der Beobachtungen über die Zellverklumpung wurden für die Versuche mit der Warburg-Technik nur solche Kulturen benutzt, deren Alter 14 Tage möglichst nicht überschritt.

2. Substratoxydation bei unterschiedlichem pH-Wert

Die Beobachtung, daß Hyphomicrobium in äthanolhaltigen Kulturen bei allmählich absinkendem pH-Wert im Wachstum gehemmt wurde, war der Grund, den Einfluß des pH-Wertes zu prüfen.

Es wurde der Universal-Puffer nach T h e o r e l l - S t e n h a g e n gewählt. Die in ihm enthaltene Zitronensäure wurde, wie Vorversuche zeigten, von H. v u l g a r e nicht oxydiert. Gewertet wurde der O_2-Verbrauch der ersten 2 St. Die dann einsetzende Abnahme war offenbar auf die toxische Wirkung des Borats zurückzuführen. Die Oxydationsgeschwindigkeit (Q_{O_2}) wurde auf das Trockengewicht der Zellen bezogen ($\mu l/mg \cdot h$).

Für alle 3 Substrate zeigt die pH-Aktivitätskurve (Abb.6) einen gleichen Verlauf. Das Optimum liegt zwischen pH 7,0 und 8,0. Nach der sauren Seite fällt die Aktivität stark ab, um bei pH 5,0 gänzlich aufzuhören. Der Abfall der Kurve ist dagegen nach der alkalischen Seite bedeutend flacher. Abb. 6 läßt weiter erkennen, daß Acetat langsamer oxydiert wird als die beiden Alkohole.

Während des Versuches waren die Suspensionen von pH 5,0 bis 8,0 gleichmäßig trübe geblieben. Bei pH 8,5 trat eine geringgradige Ausflockung, bei pH 9,0 und 10,0 dagegen eine massive Verklumpung der Zellen auf.

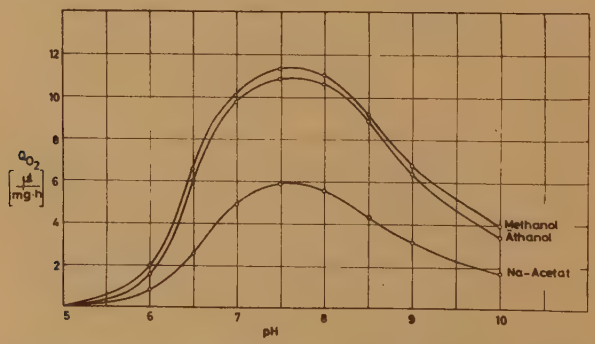


Abb. 6 Wirkung des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der Substratoxydation durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . Universalpuffer nach T h e o r e l l - S t e n h a g e n . Substratkonzentration: 1 mMol/l. Suspension: 4,0 ml. Temp.: 30°C. Die endogene Atmung ist nicht abgezogen.

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurde der O_2-Verbrauch mit dem Trisoxymethylaminomethan-Puffer zwischen pH 7,0 und 9,0 und mit dem Phosphatpuffer nach S o e r e n s e n

zwischen pH 6,0 und 8,0 geprüft. Da hier die gleiche Abhängigkeit der Aktivität ermittelt wurde, erübrigt sich eine Wiedergabe der Daten.

3. Substratoxydation bei unterschiedlicher Substratkonzentration

Um den Einfluß der Substratkonzentration zu untersuchen, wurden Suspensionen in Phosphatpufferlösung hergestellt und mit unterschiedlichen Substratmengen versetzt. Die geprüften Konzentrationen betrugen für Methanol und Äthanol 10,0 mMol/l bis 2,0 Mol/l und für Acetat 10,0 - 250 mMol/l.

Der Kurvenverlauf in Abb.7 ist bei beiden Alkoholen gleich, abgesehen von den um einen geringen Betrag niedrigeren Werten des Äthanols. Bis zu einer Konzentration von 500 mMol/l wird die Oxydation nicht beeinträchtigt. Erst oberhalb 1,0 Mol/l fällt sie steil ab. Die Dispersität der Suspension blieb auch bei der stärksten Alkoholkonzentration von 2,0 Mol/l erhalten.

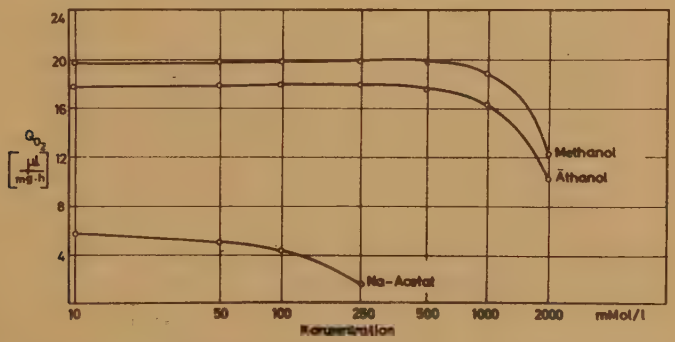


Abb. 7 Wirkung der Substratkonzentration auf die Oxydationsgeschwindigkeit von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,0 ml Suspension in Phosphatpuffer 0,03 Mol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Der O_2-Verbrauch der endogenen Atmung ist nicht abgezogen.

Die Substratkonzentrationen sind im logarithmischen Maßstab aufgetragen.

Eine wesentlich geringere Oxydationsgeschwindigkeit zeigt H. v u l g a r e beim Abbau von Acetat. Die höchsten Q_{O_2}-Werte liegen zwischen 5 und 6, während die der

Alkohole 18 bzw. 20 erreichen. Auch die Substratempfindlichkeit ist beim Acetat viel stärker ausgeprägt. Sie ist wahrscheinlich als unspezifische Elektrolytwirkung aufzufassen, denn ähnliche Hemmeffekte konnten auch durch gleiche molare Konzentrationen von Natriumchlorid und Natriumphosphat erzielt werden. Ein deutliches Nachlassen der Oxydationsgeschwindigkeit trat oberhalb einer Acetatkonzentration von 50 mMol/l auf. Die Stabilität der Suspension begann bei 100 mMol/l geringer zu werden, indem es zu einer leichten Flockenbildung kam. Bei der nächst höheren Konzentration von 250 mMol/l war schon eine starke Verklumpung sichtbar.

Der Einfluß der Substratkonzentration auf das Wachstum wurde durch einen Versuch veranschaulicht, dessen Dauer auf 17 St. ausgedehnt wurde und bei dem die Zellen Methanol als Substrat erhielten. Zunächst wurde der O_2-Verbrauch während 2 1/2 St. gemessen (Abb. 8, Kurve I). Danach wurden die Manometerhähne geöffnet. Unter Fortsetzung der Schüttelbewegung wurden die Gefäße weiter in der Warburg-Apparatur belassen.

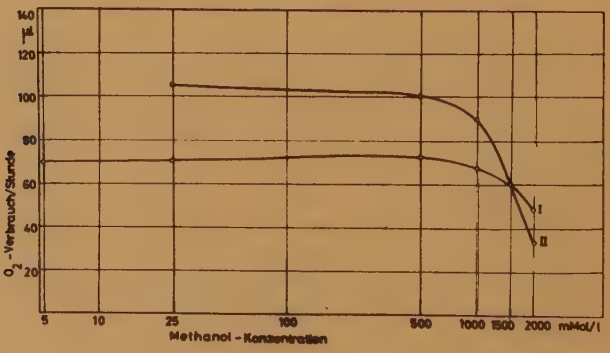


Abb. 8 Wirkung der Methanolkonzentration auf die Oxydationsgeschwindigkeit von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,0 ml Suspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration zu Beginn des Versuches: 670 mg/l (Trockengewicht). pH = 7,5; Temp.: 30 °C; Versuchsdauer: 17 Stunden. Die endogene Atmung ist nicht abgezogen. Die Methanolkonzentrationen sind im logarithmischen Maßstab aufgetragen.

Kurve I: Oxydationsgeschwindigkeit zwischen 0 und 2,5 Stunden nach Versuchsbeginn

Kurve II: Oxydationsgeschwindigkeit zwischen 14,5 und 17 Stunden nach Versuchsbeginn.

12 St. nach der letzten Ablesung wurden die Hähne wieder geschlossen und für die folgenden 2 1/2 St. nochmals der O_2-Verbrauch gemessen (Kurve II). Wegen Substraterschöpfung beginnt Kurve II erst mit dem O_2-Verbrauch bei 25 mMol/l, der auf Grund des inzwischen stattgefundenen Wachstums um 34 µl, d.h. um nahezu 50% höher liegt. Dieser O_2-Verbrauch ist in fast gleicher Höhe auch noch bei 500 mMol/l festzustellen. Danach läßt die Oxydationsgeschwindigkeit beträchtlich nach. Bei 1,5 Mol/l schneiden sich beide Kurven. Hier liegt also ein stationärer Zustand vor, bei dem die Zellen sich nicht mehr vermehren oder ein Gleichgewicht zwischen Vermehrung und Absterben besteht. Oberhalb 1,5 Mol/l tritt die schädigende Wirkung des Alkohols deutlich in Erscheinung.

4. Substratoxydation bei unterschiedlichem CO_2-Partialdruck

Auf die Notwendigkeit des CO_2 für das Wachstum von H. v u l g a r e wies erstmals M e v i u s jr. (1953) hin, der in beimpften Nährlösungen mit Natriumformiat und Ammoniumoxalat bei CO_2-Entzug kein Wachstum erhielt. Auch N ä v e k e (1957) untersuchte die Einwirkung des CO_2-Partialdruckes auf die Formiatoxydation. Er fand allerdings nur eine geringe Beeinflussung des O_2-Verbrauches, da er offenbar mit größeren Zellmengen arbeitete.

Anlaß, die Wirkung des CO_2-Entzugs zu prüfen, waren die ersten RQ-Bestimmungen mit Acetat. Dabei konnte beobachtet werden, daß der Druckabfall in den Warburg-Gefäßen mit KOH erheblich geringer war als in denen ohne KOH. Dadurch ergaben sich, verglichen mit dem theoretisch errechneten RQ-Wert für Acetat viel zu hohe Werte. Als Ursache für den herabgesetzten O_2-Verbrauch in den Gefäßen mit KOH konnte dann der niedrige CO_2-Partialdruck ermittelt werden.

Zur Ausführung der Versuche wurden die Zellen in NO_3-haltigem Basalmedium suspendiert. Hiervon wurden 4,0 ml in den Hauptraum gegeben. Die Zentralgefäße erhielten 0,5 ml KOH 50 g/l bzw. 0,5 ml dest. Wasser bzw. 0,5 ml CO_2-Puffer, der mit dem CO_2-Partialdruck der Atmosphäre ($3 \cdot 10^{-4}$ Atm.) im Gleichgewicht stand. Als Nährsubstrat erhielten die Zellen

eine bekannte Menge Methanol, Äthanol und Acetat.

Der Verlauf der Methanoloxydation zeigt nur einen geringen Unterschied in den Gefäßen mit KOH und CO_2-Puffer (Abb. 9). In beiden Fällen bleibt die insgesamt verbrauchte O_2-Menge etwa um 1/3 hinter dem theoretisch möglichen Höchstbetrag zurück, der zu erwarten ist, wenn die vorgelegte Methanolmenge vollständig zu CO_2 und H_2O oxydiert wird und keine Assimilation stattfindet. Auffallend ist aber trotzdem die Kurve für den O_2-Verbrauch in Anwesenheit des CO_2-Puffers durch ihre etwas stärkere Aufwärtskrümmung. Auch erreicht sie nach Substraterschöpfung nicht ganz die Höhe der KOH-Kurve. Der unterschiedliche Kurvenverlauf und die Enddifferenz von 24 µl ist wahrscheinlich so zu erklären, daß es nach anfänglich gleichem O_2-Verbrauch zu einem etwas größeren Zellzuwachs in den Gefäßen mit CO_2-Puffer und damit zu einem stärkeren Einbau von Substrat-C kommt. Damit verbunden ist ein vorübergehend höherer O_2-Verbrauch und eine schnellere Substraterschöpfung. Daß der CO_2-Entzug in den Gefäßen mit KOH die Intensität des O_2-Verbrauchs gegenüber der in Gegenwart von CO_2 nicht stärker herabsetzte, muß auf dem raschen Substratabbau zu CO_2 als Folge der großen Zellkonzentration beruhen. Die hohe Geschwindigkeit des Substratabbaus sorgte also für einen ausreichenden CO_2-Partialdruck in der Suspensionsflüssigkeit selbst in Anwesenheit von KOH im Zentralgefäß.

Die nächsten Versuche wurden mit Äthanol und bedeutend niedrigerer Zellkonzentration angesetzt. Sie betrug 26 mg/l im ersten Versuch, 82 mg/l im zweiten. Im ersten fiel nach 10 St. der O_2-Verbrauch in den Gefäßen mit KOH ständig ab, erkennbar an der Abkrümmung der Kurve (Abb. 10). Der Einfluß des CO_2-Partialdruckes machte sich dagegen in den Gefäßen mit höherer Zellkonzentration bedeutend weniger bemerkbar. (Abb. 11). Erst mit beginnender Substraterschöpfung trat ein Unterschied auf. Die beobachtete Differenz von 32 µl (etwa 14%) dürfte auch hier durch eine unterschiedliche Zuwachsrate bedingt sein, da beim Substrateinbau CO_2 benötigt wird und dieses in den Gefäßen mit CO_2-Puffer der Suspensionsflüssigkeit entnommen werden kann, in den Gefäßen mit KOH aber erst durch zusätzlichen Substratabbau bereit gestellt

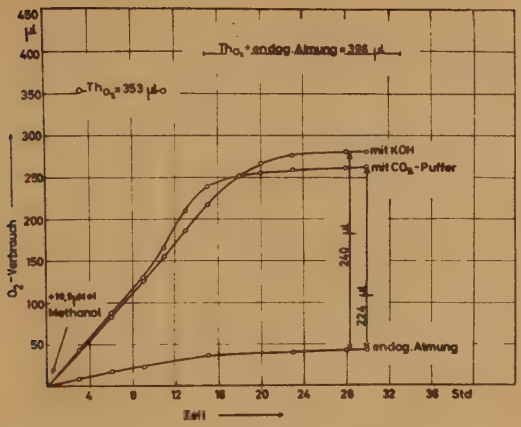


Abb. 9

Wirkung von unterschiedlichem CO_2-Partialdruck auf die Methanoloxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 160 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml KOH 50 g/l oder 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l). Methanolkonzentration: 2,33 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen. Endogene Atmung: Mittelwert aus dem O_2-Verbrauch mit KOH bzw. CO_2-Puffer im Mittelgefäß.

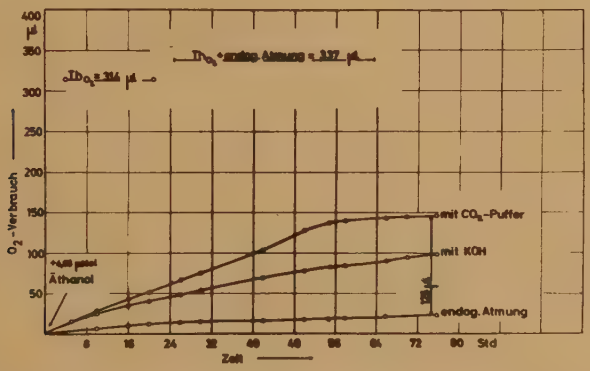


Abb. 10

Wirkung von unterschiedlichem CO_2-Partialdruck auf die Äthanoloxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 26 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml KOH 50 g/l oder 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l). Äthanolkonzentration: 1,04 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen. Endogene Atmung: Mittelwert aus dem O_2-Verbrauch mit KOH und CO_2-Puffer im Mittelgefäß.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

werden muß.

Geht also der Substratabbau langsamer vor sich (langsamere CO_2-Produktion) wie im Falle des Äthanols, hat die Zellkonzentration einen deutlichen Einfluß auf die Oxydation bei unterschiedlichem CO_2-Partialdruck.

Bemerkenswert ist der beim Äthanol im Vergleich zum Methanol noch wesentlich größere Unterschied zwischen dem theoretisch höchstmöglichen und dem tatsächlich beobachteten Gesamtverbrauch an O_2. Die Differenz beträgt hier etwa 60%. Daraus ist auf eine noch stärkere Assimilation des Äthanol-C (im Vergleich zum Methanol-C) zu schließen.

Der Einfluß des CO_2-Partialdruckes zeigte sich besonders deutlich bei der Acetatoxydation. Im ersten Versuch (Abb. 12) wurden nach einer Leerlaufzeit von 12 St. 45 µMol Acetat aus dem Seitenansatz in die Suspension gegeben. Das Ende der Oxydation wurde nicht abgewartet. In den Gefäßen mit CO_2-Puffer bzw. dest. H_2O im Zentralgefäß war ein übereinstimmender und langsam zunehmender O_2-Verbrauch festzustellen. Da bei der Acetatoxydation und dem Einbau von N aus KNO_3 Alkali-Ionen frei werden und diese das entstehende CO_2 binden, kann man den Druckabfall bei H_2O im Mittelgefäß annäherungsweise dem O_2-Verbrauch gleichsetzen. In den KOH-Gefäßen ging dagegen die Substratoxydation wesentlich langsamer vor sich.

Ein weiterer Versuch wurde mit einer wesentlich geringeren Acetatmenge (5 µMol) durchgeführt (Abb. 13). Er wurde bei Substraterschöpfung in den Gefäßen mit CO_2-Puffer abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Ansätze mit CO_2-Puffer etwa 50%, die Ansätze mit KOH dagegen erst etwa 20% der bei totaler Oxydation theoretisch möglichen O_2-Menge verbraucht.

Der Einfluß des CO_2-Entzugs auf den Substratabbau durch Hyphomicrobium scheint somit umso deutlicher zu sein, je langsamer der Abbau vor sich geht. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse war eine Beschleunigung des Acetatabbaus durch Zugabe von CO_2 zu erwarten. Um dies zu prüfen, erhielten die Suspensionen $NaHCO_3$ mit einer Endkonzentration von 5 mMol/l. Im Vergleich zu den Gefäßen ohne Bikarbonatzusatz konnte in der Tat eine günstige Beeinflussung des Acetatabbaus und auch der endogenen Atmung festgestellt werden (Abb. 14).

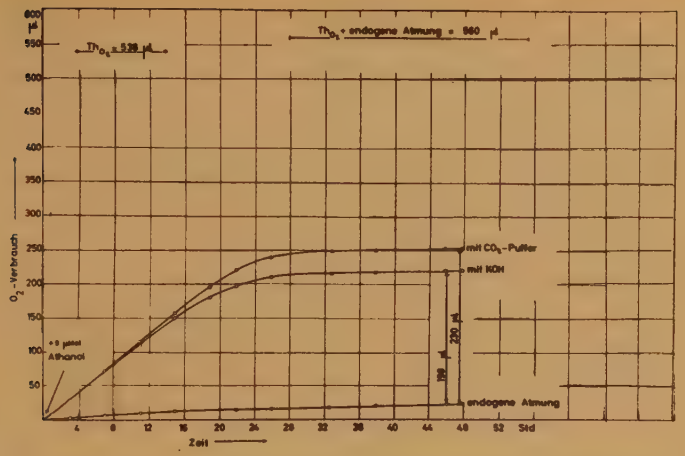


Abb. 11

Wirkung von unterschiedlichem CO_2-Partialdruck auf die Äthanoloxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 82 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml KOH 50 g/l oder 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l). Äthanolkonzentration: 1,78 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen. Endogene Atmung: Mittelwert aus dem O_2-Verbrauch mit KOH und CO_2-Puffer im Mittelgefäß.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

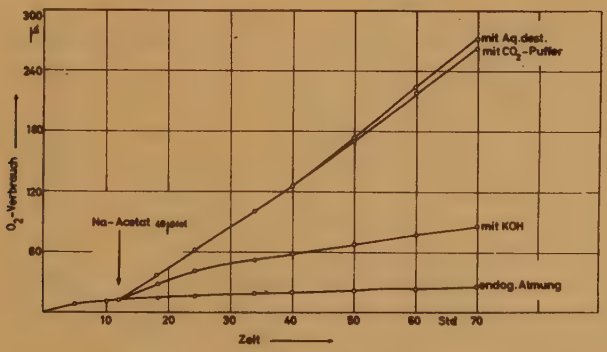


Abb. 12

Wirkung von unterschiedlichem CO_2-Partialdruck auf die Acetatoxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 118 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml KOH 50 g/l, 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l) oder 0,5 ml aq.dest. Acetatkonzentration: 10 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen. Endogene Atmung: Mittelwert aus dem O_2-Verbrauch mit KOH, CO_2-Puffer bzw. aq.dest. im Mittelgefäß.

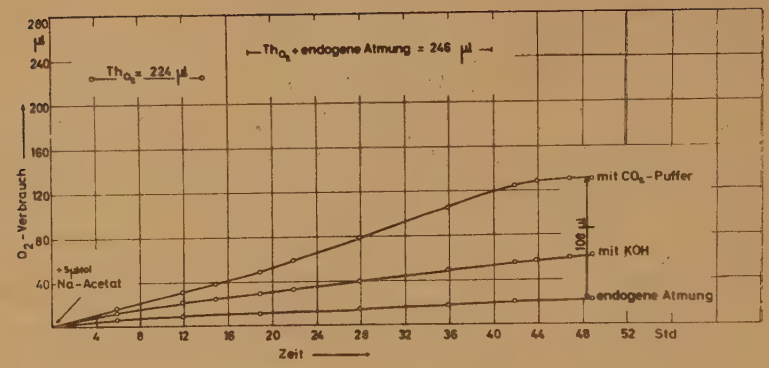


Abb. 13 Wirkung von unterschiedlichem CO_2-Partialdruck auf die Acetatoxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 85 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml KOH 50 g/l oder 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l). Acetatkonzentration: 1,1 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen. Endogene Atmung: Mittelwert aus dem O_2-Verbrauch mit KOH und CO_2-Puffer im Mittelgefäß.
Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

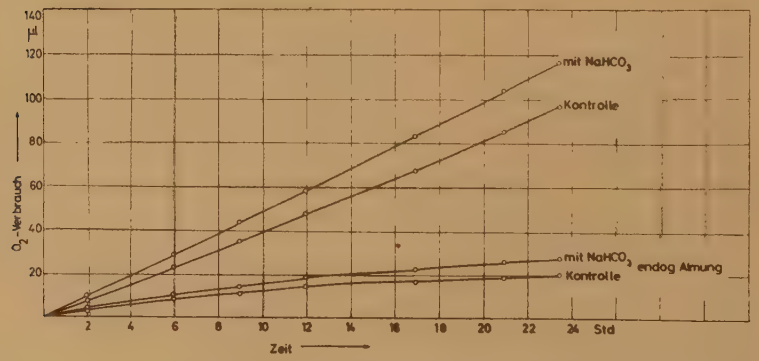


Abb. 14 Wirkung von $NaHCO_3$ (5 mMol/l) auf die Acetatoxydation von Hyphomicrobium vulgare. Zellkonzentration: 84 mg/l (Trockengewicht). Hauptraum: 4,5 ml Zellsuspension in mineralischer NO_3-haltiger Lösung. Mittelgefäß: 0,5 ml CO_2-Puffer (1 Mol/l). Acetatkonzentration: 10 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen.

5. Substratabbau bei verschiedener N-Quelle

In der zur Anzucht verwandten Lösung ist NO_3^- als N-Quelle enthalten. Dieses ist insofern gut geeignet, da es von H. v u l g a r e gut, von verunreinigenden, schnell wachsenden heterotrophen Mikroorganismen dagegen vielfach gar nicht als N-Quelle verwertet werden kann. Wegen der langen Kulturdauer ist daher diesem NO_3-haltigen Nährmedium der Vorzug zu geben. Die gleichen Erwägungen gelten auch für langfristige manometrische Versuche.

Vom energetischen Standpunkt aus betrachtet, erscheinen jedoch N-Verbindungen geeigneter, in denen der Stickstoff bereits in reduzierter Form vorliegt z.B. Ammoniumsalze.

Wie sich H. v u l g a r e NH_4-Verbindungen gegenüber verhält, ist bisher nur von K i n g m a B o l t j e s (1936) untersucht worden. Ein augenfälliger Unterschied wurde jedoch im Vergleich zum Wachstum in NO_3-haltigem Nährmedium nicht angegeben. Das Wachstum war je nach Substrat gut bzw. sehr gut.

Da es sich bei NH_4^+ und NO_3^- um energetisch verschiedenwertige Verbindungen handelt, ist zu erwarten, daß man zum Abbau gleicher Substratmengen bis zum Übergang in die endogene Atmung verschiedene O_2-Mengen benötigt, wenn gleichzeitig N assimiliert wird. Um dies zu prüfen, wurde H y p h o m i c r o b i u m in N-freiem Basalmedium suspendiert. Als NO_3^--Quelle wurde anstatt des sonst verwendeten KNO_3 das Na-Salz genommen, um damit in den Gefäßen gleichartige Ionen zu haben. $(NH_4)_2HPO_4$ diente als andere N-Quelle. Ihr wurde vor anderen NH_4-Salzen der Vorzug gegeben, um Veränderungen des pH-Wertes durch physiologische Acidität so gering wie möglich zu halten. Die Endkonzentration betrug 0,01 n.

Schon wenige Stunden nach Versuchsbeginn wurde erkennbar (Abb. 15-17), daß in Gegenwart von NH_4^+ in allen Fällen ein erhöhter O_2-Verbrauch stattfand. Substratoxydation und endogene Atmung wurden in gleicher Weise beeinflußt. Gibt man den O_2-Gesamtverbrauch in den NH_4-haltigen Gefäßen mit 100% an, so wurden in den NO_3-haltigen Parallelgefäßen bei Methanol 84%, bei Äthanol 75% und bei Acetat 78% O_2 verbraucht.

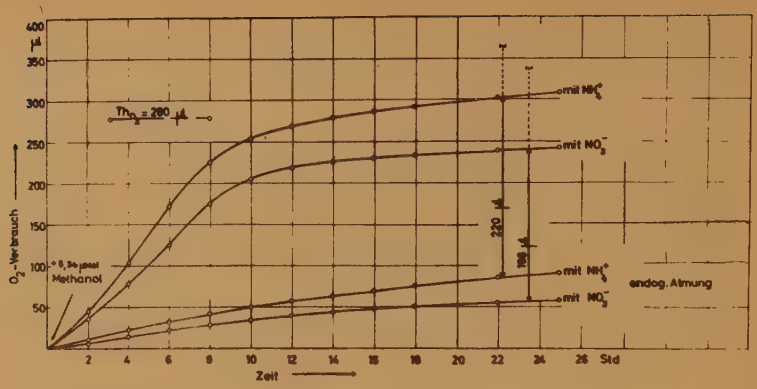


Abb. 15 Methanoloxydation durch H y p h o m i c r o - b i u m v u l g a r e mit 0,01 n $NaNO_3$ oder 0,01 n $(NH_4)_2$ H PO_4. Zellkonzentration: 172 mg/l (Trockengewicht). 4,7 ml Zellsuspension in mineralischer Lösung. Substratkonzentration: 1,77 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen.

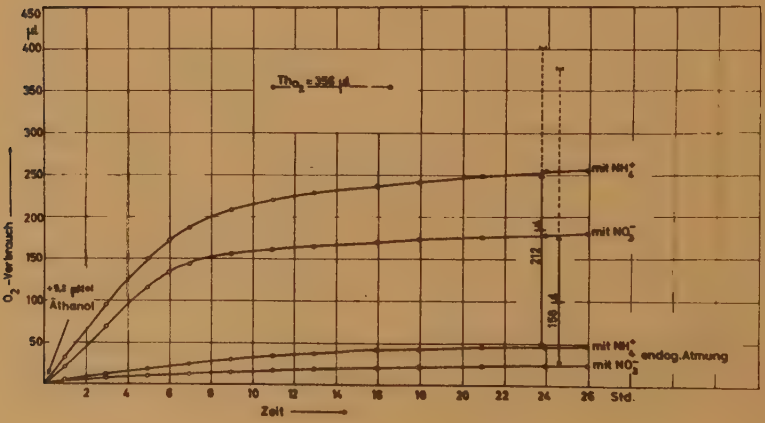


Abb. 16 Äthanoloxydation durch H y p h o m i c r o - b i u m v u l g a r e mit 0,01 n $NaNO_3$ oder 0,01 n $(NH_4)_2$ HPO_4. Zellkonzentration: 222 mg/l (Trockengewicht). 4,7 ml Zellsuspension in mineralischer Lösung. Substratkonzentration: 1,13 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratoxydation: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

⊢ Th_{O_2} + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen theoret. O_2-Verbrauch + endog. Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch

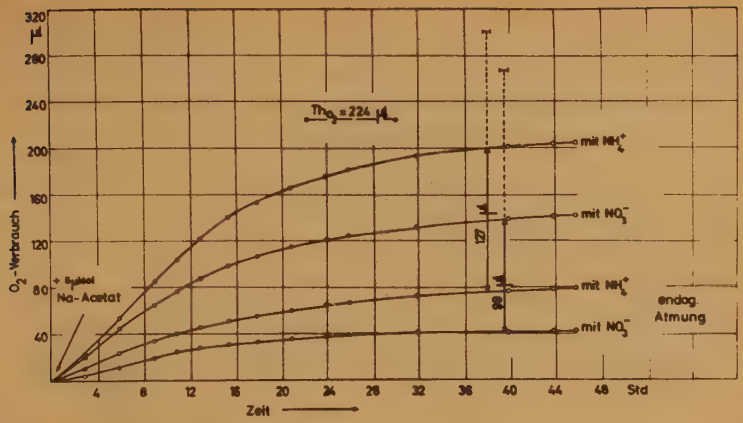


Abb. 17 Acetatoxydation durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e mit 0,01 n $NaNO_3$ oder $(NH_4)_2HPO_4$. Zellkonzentration: 176 mg/l (Trockengewicht). 4,7 ml Zellsuspension in mineralischer Lösung. Substratkonzentration: 1,1 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Substratkonzentration: Mittelwerte aus je 2 Gefäßen.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

⊢ Th_{O_2} + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen theoret. O_2-Verbrauch + endogene Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch.

Auch bei entsprechenden Versuchen mit $(NH_4)_2SO_4$ zeigte sich ein gesteigerter O_2-Verbrauch im Vergleich zu Nitrat als N-Quelle.

6. Endogene Atmung

Die Frage, ob und in welchem Maße die endogene Atmung neben der oxydativen Assimilation einhergeht, stellt ein sehr schwieriges Problem dar, wie ihre oft gegensätzliche Beantwortung in der Literatur zeigt. Untersuchungen, die eine völlige Unterdrückung der Eigenatmung während der exogenen Respiration ergeben haben, stehen solchen gegenüber, bei denen die endogene Atmung weiter fortgesetzt wird.

Auch mit Hilfe der Tracer-Technik läßt sich das Problem der endogenen Atmung nicht in befriedigender Weise aufklären.

Dieses wird durch die Vorstellung begreiflich, daß in der Zelle Intermediärprodukte vorhanden sind, die dem endogenen und exogenen Stoffwechsel gemeinsam zur Verfügung stehen, so daß Austauschvorgänge leicht möglich sind.

Jedenfalls können bei Außerachtlassen der mit der endogenen Atmung verbundenen Gasumsätze die manometrisch ermittelten Untersuchungsergebnisse leicht zu Fehlbeurteilungen führen. Wie man den bisherigen Kurvenbildern entnehmen kann, ist das relative Ausmaß der endogenen Atmung oft beträchtlich, verglichen mit der Atmung bei Substratzugabe. Weit auseinander liegende Q_{O_2}-Werte bei der Methanol- und Athanoloxydation einerseits und der Acetatoxydation andererseits ließen es zweckmäßig erscheinen, die endogene Atmung dabei zu berücksichtigen. Außerdem war es nicht ausgeschlossen, daß aus abgestorbenen Zellen autolytisch abgebaute Substanzen dem Stoffwechsel lebender Zellen zugeführt werden. Der Abbau dieser unvermeidbaren Nebenprodukte würde dann bei der Messung der "endogenen Atmung" mit erfaßt werden.

Um über die Substrate der endogenen Atmung eine Vorstellung zu bekommen, wurden RQ-Bestimmungen durchgeführt. Die gefundenen Werte (s. Tab. 1) variierten zwischen 0,85 und 0,94. Der Mittelwert von 0,9 läßt die Zuordnung zu einer bekannteren Stoffklasse nicht zu. Es ist daher anzunehmen, daß sich dieser Wert aus der Oxydation verschiedenartiger Reservesubstanzen ergeben hat, etwa aus denen von Fetten und Kohlehydraten oder niederen Fettsäuren.

7. Die RQ-Werte bei Oxydation von Methanol, Äthanol und Acetat

Unter der Voraussetzung, daß der Substratabbau zu CO_2 und H_2O führt, muß der experimentell ermittelte RQ-Wert (CO_2/O_2) für Methanol und Athanol 0,67, für Acetat 1,0 betragen:

(1) $2\ CH_3OH + 3\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + 4\ H_2O$ (RQ = 0,67)
(2) $C_2H_5OH + 3\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + 3\ H_2O$ (RQ = 0,67)
(3) $CH_3COOH + 2\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O$ (RQ = 1,00)

Die RQ-Bestimmungen wurden mit wachsenden Hyphomicrobium-Zellen in der üblichen NO_3-haltigen Nährlösung vorgenommen, außerdem mit ruhenden Zellen in 0,03M Phosphatpuffer, da zu

Zellen suspendiert in	Alter der Anzuchtkultur in Tagen	Versuchs-dauer in Stunden	Gasumsatz in µl				RQ
			gebildetes CO_2			verbrauchtes O_2	
			gebunden	frei	Summe		
Basalmedium	9	7,0	35,6	20,7	56,3	61,7	0,91
"	10	19,5	54,5	14,1	68,6	75,5	0,91
"	12	15,5	35,8	7,7	43,5	51,2	0,85
"	14	20,0	51,0	8,4	59,4	68,7	0,86
"	14	13,5	57,6	37,9	95,5	101,7	0,94
"	17	12,0	11,6	15,5	27,1	30,0	0,90
						Mittel:	0,90

Tab.:1 Gasumsatz bei der endogenen Atmung von H y p h o m i c r o - b i u m v u l g a r e
Basalmedium = mineralische Lösung mit 1,0 g/l KNO_3 als N-Quelle
Suspension 4,0 ml; pH = 7,5; Temp.: 30° C.

erwarten war, daß Wachstumsvorgänge den RQ-Wert verändern. In einigen Versuchen wurde zusätzlich der Gasumsatz der endogenen Atmung gemessen, um damit die Werte der Substratoxydation zu korrigieren. Die Versuchsanordnung für die Acetatoxydation unterschied sich von der für den Methanol- und Äthanolabbau dadurch, daß die Zentralgefäße anstelle von 5% KOH einen CO_2-Puffer enthielten. Da die Versuche über den Einfluß des CO_2-Partialdruckes die Notwendigkeit einer ausreichenden Zellkonzentration für Äthanol in KOH-Gefäßen gezeigt hatten, wurde allgemein eine entsprechend große Zelldichte (stets über 100 mg/l Trockengewicht) gewählt. Das Alter der Kulturen variierte zwischen 10-28 Tagen, die Versuchsdauer zwischen 30 Min. - 19 St.

Die RQ-Werte für Methanol (Tab. 2) liegen mit wenigen Ausnahmen etwas zu hoch, trotzdem noch so nahe dem theoretischen Wert von 0,67, daß sie als Beweis für den Abbau nach der Bruttogleichung (1) angesehen werden können.

Die Korrektur durch die Restatmung hat die RQ-Werte für Methanol im Mittel nur wenig dem theoretischen Wert genähert. Die von ruhenden Zellen ermittelten RQ-Werte waren denen wachsender Zellen ähnlich. Eine Abhängigkeit des RQ-Wertes von Kulturalter und Versuchsdauer ist aus den Versuchsdaten nicht zu ersehen.

Die RQ-Werte des Acetatabbaus (Tab. 4) fielen etwa so aus, daß sie der Bruttogleichung (3) entsprechen. Wegen des niedrigen Q_{O_2}-Wertes konnten kurzfristige Versuche, wie sie der schnelle Abbau des Methanols ermöglichte, nicht durchgeführt werden. Die kürzeste Versuchsdauer betrug 8, die längste 19 St. Da für die RQ-Bestimmungen das Na-Salz der Essigsäure genommen wurde und daher nach der Oxydation Na-Ionen zurückblieben, lag das gebildete CO_2 bei Versuchsende größtenteils in gebundener Form als $NaHCO_3$ vor. Die geringe Menge des freien CO_2 dürfte zum Teil von der endogenen Atmung herrühren. Eigenartigerweise liegen die von ruhenden Zellen gewonnenen Daten unterhalb des theoretischen Wertes von 1,0, während die wachsender Zellen Werte über 1,0 ergeben haben. Der Abzug der endogenen Atmung erhöht die RQ-Werte etwas, er bringt die der Bestimmungen bei ruhenden Zellen näher an den theoretischen

Zellen suspendiert in	Alter d. Anzuchtkulturen in Tagen	Versuchsdauer in Stunden	Gasumsatz in µl: Methanoloxydation + endog. Atmung – gebildetes CO_2 gebunden	frei	Summe	verbrauchtes O_2	Endogene Atmung – gebildetes CO_2 gebunden	frei	Summe	verbrauchtes O_2	RQ unkorr.	korr.
Basalmedium	10	0,50	27,8	3,5	31,3	42,8					0,73	
"	11	3,00	43,6	24,1	67,7	86,7					0,78	
"	12	1,00	28,2	26,9	55,1	72,4					0,76	
"	12	15,00	106,1	53,3	159,4	233,9					0,68	
"	12	1,25	37,7	13,1	50,8	71,9	4,3	0,4	4,7	4,2	0,71	0,68
"	13	10,25	50,6	76,7	127,3	171,1					0,74	
"	16	1,00	35,1	21,5	56,6	71,8					0,79	
"	17	0,75	30,7	17,6	48,3	65,4					0,74	
"	17	12,00	82,3	174,1	256,4	430,3					0,60	
"	18	0,75	47,6	8,8	56,4	74,3	5,6	0,5	6,1	6,3	0,76	0,74
"	24	1,25	40,8	11,1	51,9	67,4	8,6	0,5	9,1	9,8	0,77	0,74
									Mittel		0,73	0,72
Phosphatpuffer	11	3,50	137,2	72,4	209,6	296,1	36,6	0,0	36,6	35,2	0,71	0,66
"	14	2,50	51,1	47,1	98,2	124,2	7,9	0,0	7,9	8,2	0,79	0,78
"	14	6,00	64,5	25,8	90,3	122,9	8,8	1,9	10,7	12,7	0,74	0,72
									Mittel		0,75	0,72

Tab. 2: Gasumsatz bei der Methanoloxydation durch ruhende und wachsende Zellen von *Hyphomicrobium vulgare*

Weitere Angaben und Zeichenerklärung siehe Tab. 4

Zellen suspendiert in	Alter d. Anzuchtkulturen in Tagen	Versuchsdauer in Stunden	Gasumsatz in µl: Äthanoloxydation + endog. Atmung: gebildetes CO_2 gebunden	gebildetes CO_2 frei	gebildetes CO_2 Summe	verbrauchtes O_2	Endogene Atmung: gebildetes CO_2 gebunden	gebildetes CO_2 frei	gebildetes CO_2 Summe	verbrauchtes O_2	RQ unkorr.	RQ korr.
Basalmedium	10	8,50	29,0	26,7	55,7	86,5	9,5	0,7	10,2	9,4	0,64	0,59
"	12	15,50	96,2	87,8	184,0	257,1					0,71	
"	12	6,00	20,5	86,8	107,3	218,4					0,49	
"	14	* 16,00	108,0	90,5	198,5	267,2	26,8	3,0	29,8	30,3	0,75	0,72
"	14	12,50	8,0	89,6	97,6	173,0					0,56	
"	15	6,00	6,8	80,9	87,7	158,1	13,6	2,5	16,1	17,3	0,55	0,51
"	16	5,75	40,0	13,2	53,2	85,4	11,1	1,1	12,2	12,4	0,62	0,56
"	16	6,00	25,6	72,5	98,1	179,8					0,55	
"	24	* 16,50	73,9	47,8	121,7	175,7					0,69	
									Mittel		0,62	0,58
Phosphatpuffer	12	* 11,5	82,1	3,1	85,2	131,6	16,1	2,2	18,3	19,5	0,65	0,60
"	14	4,00	27,3	17,3	44,6	111,6	8,5	1,6	10,1	11,3	0,40	0,34
"	14	5,50	3,2	62,1	65,3	209,1	18,3	0,6	18,9	19,1	0,32	0,24
"	17	3,00	25,8	34,2	60,0	174,4	10,1	1,7	11,8	12,1	0,34	0,30
									Mittel		0,43	0,37

Tab. 3: Gasumsatz bei der Äthanoloxydation durch ruhende und wachsende Zellen von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e

Weitere Angaben und Zeichenerklärung siehe Tab. 4

Zellen suspendiert in	Alter d. Anzuchtkulturen in Tagen	Versuchsdauer in Stunden	Gasumsatz in µl: Acetatoxydation + endog.Atmung: gebildetes CO_2 gebunden	gebildetes CO_2 frei	gebildetes CO_2 Summe	verbrauchtes O_2	Endogene Atmung: gebildetes CO_2 gebunden	gebildetes CO_2 frei	gebildetes CO_2 Summe	verbrauchtes O_2	RQ unkorr.	RQ korr.
Basalmedium	10	10,50	101,9	9,1	111,0	101,6	22,9	4,2	27,1	30,5	1,09	1,18
"	12	19,00	174,1	7,6	181,7	170,2					1,06	
"	16	15,25	183,0	8,6	191,6	171,1	29,9	9,9	39,8	38,9	1,12	1,15
"	21	16,00	102,6	9,8	112,4	104,9	32,7	8,6	41,3	39,6	1,07	1,09
"	21	14,25	84,9	8,7	93,6	85,5					1,09	
"	28	19,00	72,2	2,8	75,0	69,7					1,08	
									Mittel		1,08	1,14
Phosphatpuffer	11	10,00	121,7	2,9	124,6	136,2	41,3	4,3	45,6	52,6	0,91	0,94
"	12	19,00	58,8	2,3	61,1	63,0	22,3	2,8	25,1	26,8	0,97	0,99
"	14	8,00	112,7	5,2	117,9	126,4	36,0	5,9	41,9	46,5	0,93	0,95
									Mittel		0,94	0,96

Tab. 4: Gasumsatz bei der Acetatoxydation durch ruhende und wachsende Zellen von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e

Basalmedium (mineralische Lösung mit 1,0 g/l KNO_3 als Stickstoffquelle) für wachsende Zellen (pH = 7,5)

Phosphatpuffer (0,03 Mol/l; pH = 7,5) für ruhende Zellen

RQ unkorr. (= unkorrigiert): Quotient aus den Gesamtgasumsätzen

RQ korr. (= korrigiert): Quotient aus den Gesamtgasumsätzen abzgl.endog.Atmung

Suspension 4,0 ml; Substratkonzentration 10 mMol/l; Temp. 30°C

Wert heran, während die RQ-Werte von wachsenden Zellen etwas davon entfernt werden.

Stark schwankende Ergebnisse erbrachten die RQ-Bestimmungen des Äthanolabbaus. Hier konnte im Unterschied zu den anderen Versuchen ein Zusammenhang mit der Versuchsdauer aufgedeckt werden. Damit ließen sich auch Anhaltspunkte für den möglichen Abbauweg des Äthanols finden.

Wenn man Tab. 3 betrachtet, so fällt auf, daß bei kurzer Versuchsdauer von 3-6 St. die RQ-Werte niedrig ausfallen. Längere Versuchszeiten (15-16 St.) lassen sie ansteigen und gleichen sie dem theoretischen Wert 0,67 an. Die niedrigsten Werte von 0,32 und 0,34 wurden bei ruhenden Zellen gefunden. Eine Korrektur durch die Restatmung brachte diese noch weiter zum Absinken.

Wenn man annimmt, daß die erste nachweisbare Abbaustufe des Äthanols Essigsäure ist und die zu ihrer Bildung notwendigen Oxydationen rasch, die folgenden Reaktionsabläufe dagegen langsam erfolgen, so muß es zu einer Anhäufung dieser Säure kommen. Auf diese Möglichkeit deutet auch die Beobachtung hin, daß der pH-Wert in den Anzuchtkulturen mit Äthanol und ebenso während langer manometrischer Versuche absinkt. Der niedrige Q_{O_2}-Wert des Acetats zeigt außerdem, daß Essigsäure nur langsam verarbeitet werden kann.

Tatsächlich konnte Essigsäure sowohl in 12-14 Tagen alten Anzuchtkulturen mit Athanol als auch in den Suspensionen der manometrischen Versuche mit Athanol (Versuchsdauer 16 St.) nachgewiesen werden.

Da die Reaktion $CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$ einen RQ-Wert von Null hat und demnach die Anhäufung von Essigsäure für die niedrigen RQ-Werte verantwortlich zu machen ist, mußten Versuche bis zur Substraterschöpfung bessere Ergebnisse erbringen. Deshalb wurde in drei Fällen (in Tab. 3 durch einen Stern gekennzeichnet) das Ende der Substratoxydation abgewartet. Die so gefundenen RQ-Werte lagen, auch nach der Korrektur durch die endogene Atmung, in der Nähe des theoretischen Wertes. Die Senkung der RQ-Werte weit unter den theoretischen Wert durch ruhende Zellen wäre dann so zu erklären,

daß diese die weitere Dehydrierung der Essigsäure noch langsamer vollziehen als wachsende.

Zusammenfassend läßt sich über die RQ-Bestimmungen sagen, daß der Methanol- und Acetatabbau in allen Fällen RQ-Werte ergibt, die der vollständigen Oxydation zu CO_2 und H_2O entsprechen, der Äthanolabbau im Gegensatz dazu von der Versuchsdauer abhängende RQ-Werte. Dieses bezieht sich in gleicher Weise auf den Substratabbau durch ruhende und durch wachsende Zellen. Eine Abhängigkeit der RQ-Werte vom Kulturalter war bei keinem Substrat feststellbar. Die endogene Atmung verändert die RQ-Werte in allen Fällen nur relativ wenig.

8. Oxydative Assimilation und Energetik

Läßt man Hyphomicrobium eine gegebene Menge Substrat abbauen, machen die verbrauchten O_2- und gebildeten CO_2-Mengen nur einen Teil der bei vollständiger Oxydation zu erwartenden aus. Der fehlende Anteil ist der Assimilation zuzuschreiben. Das Verhältnis der ermittelten Gaswerte zu den berechneten (z.B. O_2/Th_{O_2}) ermöglicht daher Rückschlüsse auf das Ausmaß der Assimilation und der dafür aufgewendeten Energie. Unter der Annahme, daß die Endprodukte der Assimilation etwa das Reduktionsniveau der Glukose annehmen und daß CO_2 gemäß der bekannten Bruttogleichung der Photosynthese assimiliert wird, beträgt der Energieaufwand $\Delta F_1 = +114$ kcal. Die gemäß den Gleichungen auf S. 24 nach totaler Substratoxydation frei werdende Energie ΔF_2 beträgt für Methanol - 331,4, Athanol -315,1 und Acetat -202,2 kcal, nach den Angaben von Burton (1957) berechnet.

Aus den auf gleiche Molarität bezogenen ΔF-Werten und dem Verhältnis $\Delta O_2/Th_{O_2}$ läßt sich der thermodynamische Nutzeffekt aus folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Nutzeffekt} = \frac{\Delta F_1 \cdot \frac{\Delta O_2}{Th_{O_2}} \cdot 100}{\frac{\Delta F_2}{\text{Mol } O_2}}$$

Diese Gleichung erlaubt allerdings keine genaue quantitative Aussage über die Energieausnutzung der Substratoxydation, sondern ihre Ergebnisse haben nur den Wert einer Schätzung

Stickstoff-quelle	Th_{O_2} µl	O_2 µl	O_2/Th_{O_2}	$\Delta O_2/Th_{O_2}$	Nutzeffekt %
NO_3^-	336	238	0,71	0,29	30
NO_3^-	366	260	0,71	0,29	30
NO_3^-	329	236	0,72	0,28	29
NO_3^-	396	282	0,71	0,29	30
NO_3^-	260	190	0,73	0,27	28
NO_3^-	342	230	0,67	0,33	34
NO_3^-	353	238	0,67	0,33	34
NO_3^-)	270	175	0,65	0,35	36
NH_4^+)	270	216	0,80	0,20	21
NO_3^-)	280	186	0,66	0,34	35
NH_4^+)	280	219	0,78	0,22	23
NH_4^+	312	234	0,75	0,25	26
NH_4^+	245	198	0,81	0,19	20
	Mittel des Nutzeffektes (NO_3^-):				32
	Mittel des Nutzeffektes (NH_4^+):				23

Tab. 5: O_2-Umsatz beim Verbrauch einer bekannten Menge Methanol durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e .
Suspension 4,7 ml; pH = 7,5; Temp.: 30°C.
Th_{O_2} = O_2-Umsatz bei vollständiger Substratoxydation;
O_2 = gemessener O_2-Umsatz
ΔO_2 = Differenz aus berechnetem und gemessenem O_2-Umsatz
Mit der gleichen Zellsuspension durchgeführte Versuche sind durch eine Klammer) gekennzeichnet.
Die endogene Atmung ist abgezogen.

Stickstoff-quelle	Th_{O_2} µl	O_2 µl	O_2/Th_{O_2}	$\Delta O_2/Th_{O_2}$	Nutzeffekt %
NO_3^-	240	105	0,44	0,56	61
NO_3^-	368	135	0,37	0,63	69
NO_3^-	240	98	0,41	0,59	64
NO_3^-	284	106	0,37	0,63	69
NO_3^-	445	171	0,38	0,62	68
NO_3^-	538	198	0,37	0,63	69
NO_3^-)	450	188	0,42	0,58	63
NH_4^+)	450	241	0,54	0,46	50
NO_3^-)	356	158	0,44	0,56	61
NH_4^+)	356	212	0,60	0,40	44
NH_4^+	541	308	0,57	0,43	47
NH_4^+	302	176	0,58	0,42	46
	Mittel des Nutzeffektes (NO_3^-):				66
	Mittel des Nutzeffektes (NH_4^+):				47

Tab. 6: O_2-Umsatz beim Verbrauch einer bekannten Menge Äthanol durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . Suspension 4,7 ml; pH = 7,5; Temp.: 30°C.

Th_{O_2} = berechneter O_2-Umsatz bei vollständiger Substratoxydation

O_2 = gemessener O_2-Umsatz

ΔO_2 = Differenz aus berechnetem und gemessenem O_2-Umsatz

Mit der gleichen Zellsuspension durchgeführte Versuche sind durch eine Klammer) gekennzeichnet. Die endogene Atmung ist abgezogen.

Stickstoff-quelle	Th_{O_2} µl	O_2 µl	O_2/Th_{O_2}	$\Delta O_2/Th_{O_2}$	Nutzeffekt %
NO_3^-	224	111	0,50	0,50	57
NO_3^-	224	104	0,46	0,54	61
NO_3^-	224	111	0,50	0,50	57
NO_3^-	224	105	0,47	0,53	60
NO_3^-	224	106	0,47	0,53	60
NO_3^-	224	110	0,49	0,51	58
NO_3^-)	224	98	0,44	0,56	63
NH_4^+)	224	127	0,57	0,43	49
NO_3^-)	224	101	0,45	0,55	62
NH_4^+)	224	133	0,59	0,41	46
NH_4^+	224	121	0,54	0,46	52
NH_4^+	224	126	0,56	0,44	50
			Mittel des Nutzeffektes (NO_3^-):		60
			Mittel des Nutzeffektes (NH_4^+):		49

Tab. 7: O_2-Umsatz beim Verbrauch einer bekannten Menge Acetat durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e .
Suspension 4,5 ml; pH = 7,5; Temp.: 30°C.
Th_{O_2} = berechneter O_2-Umsatz bei vollständiger Substratoxydation.
O_2 = gemessener O_2-Umsatz
ΔO_2 = Differenz aus berechnetem und gemessenem O_2-Umsatz

Mit der gleichen Zellsuspension durchgeführte Versuche sind durch eine Klammer) gekennzeichnet.
Die endogene Atmung ist abgezogen.

(N ä v e k e 1957), da außer CO_2 auch Teile des Substrates assimiliert werden.

Die Hauptschwierigkeit der Versuche, in denen das Substrat bis zur völligen Erschöpfung abgebaut werden sollte, bestand darin, daß das Ende der Substratoxydation nicht sicher zu erkennen war. Die Kurven stiegen zunächst steil an, gingen dann stets in einen schwach gekrümmten Bogen über und nahmen schließlich einen geringfügig ansteigenden Verlauf. Die Versuche wurden dann abgebrochen, wenn der O_2-Verbrauch annähernd so groß war wie der Anfangswert der endogenen Atmung. Eine völlige Übereinstimmung hätte sich erst nach sehr langer Versuchsdauer erreichen lassen.

Da die Art der N-Quelle einen Einfluß auf die Assimilationsvorgänge hat (siehe S. 21), wurden die Versuche sowohl mit NO_3^- als auch mit NH_4^+ durchgeführt. Hierbei zeigte sich der schon in Abschnitt 5 beschriebene Unterschied im O_2-Gesamtverbrauch (Tab. 5-7). Bei jedem Substrat war das Verhältnis O_2/Th_{O_2} mit NO_3^- um 15-20% geringer als mit NH_4^+. Vergleicht man weiter die einander zugehörigen O_2/Th_{O_2}-Werte der verschiedenen Substrate, so erkennt man, daß der Abbau von Acetat und Äthanol ähnliche, der von Methanol erheblich größere Werte ergeben hat. Beide Befunde sind ohne Zweifel auf eine unterschiedliche Assimilation zurückzuführen. Entsprechend ist der aus dem O_2-Verbrauch berechnete Nutzeffekt von Methanol nur etwa halb so groß wie der von Äthanol und Acetat.

Die Differenz zwischen dem O_2-Verbrauch in Gegenwart von NO_3^- und NH_4^+ ist folgendermaßen zu erklären: Nitrat kann als N-Quelle erst dann zum Aufbau der Zellsubstanz verwandt werden, wenn es zuvor zu NH_4^+ reduziert worden ist. Diese Reduktion ist ein endergonischer Vorgang. Der dazu erforderliche Wasserstoff wie auch die Energie entstammen dem Substrat. Man kann den Vorgang durch folgende Gleichung ausdrücken, wobei das Symbol für Substrat (CH_2O) sei:

$$2(CH_2O) + NO_3^- \longrightarrow 2\ CO_2 + NH_3 + OH^- - 133{,}0\ \text{kcal}$$

Je Mol NO_3^- werden 2 Mole Substrat zu CO_2 oxydiert unter gleichzeitiger Reduktion von NO_3^- zu NH_3, ohne daß O_2 aufgenommen wird. Diesem Mol NO_3^- entsprechen 2 Mole O_2, die bei

Assimilation von NH_4^+ zusätzlich verbraucht werden:

$$2\ (CH_2O) + 2\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O\ -228{,}8\ kcal$$

Die N-Assimilation ist daher als Ursache für den unterschiedlichen O_2-Verbrauch anzusehen. Dadurch ergeben sich auch die differierenden Werte des thermodynamischen Nutzeffektes, wenn man den O_2-Verbrauch je Mol Substrat zugrunde legt.

In welchem Maße C assimiliert wird, läßt sich daher am besten aus den Ergebnissen der Versuche mit NH_4^+ beurteilen, da hierbei andere O_2- und energieverbrauchende Vorgänge nur eine unwesentliche Rolle spielen.

So wurden mit NH_4^+ als N-Quelle für den Abbau von Methanol etwa 20-25% weniger O_2 verbraucht, als es bei völliger Oxydation zu CO_2 und H_2O der Fall gewesen wäre. Bei Äthanol und Acetat lag diese Prozentzahl um 45%, also etwa doppelt so hoch. Da die O_2-Differenz ein Maß für die C-Assimilation ist, kann man daraus schließen, daß je Mol Substrat bei C_2-Verbindungen doppelt so viel C assimiliert wird als bei C_1-Verbindungen.

Eine Vorstellung über den Substratab- und -einbau kann man durch die Assimilationsgleichungen erhalten. Wenn man die gefundenen O_2-Werte in Mol umrechnet und sie zu den Mol-Mengen des Substrats in Beziehung setzt, würden für H. v u l g a r e die Gleichungen der oxydativen Assimilation von Methanol, Äthanol und Acetat mit NH_4^+ als N-Quelle folgendermaßen lauten:

$$3\ CH_3OH + 3{,}5\ O_2 \longrightarrow (CH_2O) + 2\ CO_2 + 5\ H_2O$$

$$C_2H_5OH + 2\ O_2 \longrightarrow (CH_2O) + CO_2 + 2\ H_2O$$

$$CH_3COOH + O_2 \longrightarrow (CH_2O) + CO_2 + H_2O$$

Aus diesen Gleichungen ist ebenfalls zu ersehen, daß der RQ-Wert durch die Assimilation beeinflußt werden kann. Während Acetat einen gleichen RQ-Wert für die vollständige Oxydation und die oxydative Assimilation hat, ergeben Äthanol sowie Methanol unterschiedliche Werte.

9. Methylenblau als Wasserstoffacceptor bei der Oxydation von Methanol, Äthanol und Acetat

Durch die Thunberg-Methodik sollte geprüft werden, ob bei der Substratoxydation anstelle von O_2 Methylenblau als Wasserstoffacceptor fungieren kann. Mit Methanol und Äthanol (0,2 mMol/l) vollzog sich die Entfärbung von 0,5 µMol Methylenblau durch 3-5 mg H.-Zellen in Phosphatpuffer schon nach 20-30 Min. Wesentlich längere Zeit nahm die Reduktion des Methylenblau mit Acetat in Anspruch. Außerdem war eine noch dichtere Zellkonzentration nötig. 8-10 mg Zellen entfärbten das Methylenblau erst nach 75-90 Min. Da in den Kontrollgefäßen ohne Substratzusatz die Farbintensität bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls deutlich nachgelassen hatte, lassen sich die Versuchsergebnisse mit Acetat nicht sicher auswerten.

10. Oxydation von Substanzen des Tricarbonsäurecyclus

Die bisherigen Untersuchungen haben wahrscheinlich gemacht, daß Hyphomicrobium einen Teil seines Substrats assimiliert, insbesondere wenn es sich um C_2-Körper handelt. Sollte Essigsäure nach Kondensation mit Oxalessigsäure unter Bildung von Citronensäure in den Tricarbonsäurecyclus einbezogen werden, wäre anzunehmen, daß auch die Intermediärsubstanzen dieses Cyclus ein- bzw. abgebaut werden, sofern sie in die Zellen eindringen. Um dieses zu prüfen, erhielten die mit Acetat herangezogenen Zellsuspensionen die betreffenden Stoffe zugesetzt. Zum Vergleich diente die Oxydation von Acetat, Äthanol und Methanol. Die Versuchsdauer betrug durchschnittlich 8 Stunden. Nach Abzug des O_2-Verbrauchs der endogenen Atmung wurde der Q_{O_2}-Wert berechnet (Tab. 8).

Von den Zwischenstufen des Tricarbonsäurecyclus wurde nur Brenztraubensäure in nennenswertem Maße oxydiert (Q_{O_2} = 2,2 gegenüber 6,6 für Acetat). Der Q_{O_2}-Wert für Oxalessigsäure erscheint wegen der Instabilität dieser Verbindung fraglich. Alle anderen Q_{O_2}-Werte liegen unter 1 und sind wegen der Fehlermöglichkeiten bei den manometrischen Untersuchungen mit H. v u l g a r e als ungenau anzusehen.

Diese Ergebnisse sprechen weder für noch gegen das Vorhandensein des Tricarbonsäurecyclus. Sie sind vielleicht der

Ausdruck für die unterschiedliche Permeabilität der Zellen gegenüber den verschiedenen Substraten.

Substrat (10 mMol/l)	Q_{O_2}
Acetat*	6,6
Succinat	0,8
Fumarat	0,5
Malat	0,9
Oxalacetat	(6,5)
Pyruvat	2,2
Citrat	0,0
α-Ketoglutarat	0,2
Äthanol*	20,4
Methanol*	22,4
endog. Atmung*	2,6

Tab. 8: O_2-Verbrauch bei der Oxydation von Substanzen des Tricarbonsäurecyclus durch H y p h o m i c r o - b i u m v u l g a r e .
Q_{O_2} = O_2-Verbrauch in µl je mg Zellen (Trockengewicht) und St. Suspension: 4,5 ml in Basalmedium mit NO_3^- als N-Quelle. Alter der Kultur: 10-12 Tage; Substratkonzentration: 10 mMol/l; pH = 7,5; Temp.: 30°C.

* Mittel aus 10 Bestimmungen, sonst Mittel aus 2-3 Bestimmungen.

11. Die Wirkung von Enzym-Hemmstoffen

Es ist bekannt, daß die Wirkung vieler Hemmstoffe von Säurecharakter in hohem Maße von der H-Ionenkonzentration abhängig ist, da nur die freien, undissoziierten Säuremoleküle in die Zelle eindringen und dort reagieren. Da bei Versuchen mit intakten Zellen der pH-Wert der Nährlösung nur schwer völlig konstant zu halten ist, erfährt hierdurch die Einwirkung von Enzym-Hemmstoffen eine Einschränkung. Trotz dieser Schwierigkeiten wurde versucht, mit Hilfe von Hemmstoffen eine Vorstellung über die an der Substratoxydation beteiligten Enzyme von H. v u l g a r e zu erhalten.

Zunächst wurde die Wirkung von DNP und NaN_3 untersucht. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die synthetische Reaktionen zum Aufbau von Zellsubstanz verhindern. Bei geeigneter DNP-Konzentration und genügend langer Versuchsdauer erreichte

N ä v e k e (1957) tatsächlich bei H y p h o m i c r o - b i u m die totale Oxydation einer gegebenen Menge Formiat zu CO_2 und H_2O, der Beweis für die Ausschaltung der Assimilation. Da DNP und NaN_3 eine stimulierende Wirkung auf die endogene Atmung ausüben (M o s e s und S y r e t t (1955), wurde diese stets mit berücksichtigt. Bei den Versuchen mit KCN und den Wirkstoffen des Tricarbonsäurecyclus wurde das Ende der Substratoxydation nicht abgewartet.

a) 2,4-Dinitrophenol (DNP)

In orientierenden Versuchen wurde zunächst die Wirkung von DNP auf die endogene Atmung geprüft. Hierbei zeigte sich, daß $1 \cdot 10^{-3}$ und $5 \cdot 10^{-3}$ M deutlich förderten (Abb. 18). Im Vergleich zu den Kontrollen ohne DNP hatte sich der O_2-Verbrauch nach 30 St. fast verdoppelt bzw. verdreifacht. Höhere Konzentrationen (in der Abb. nicht angegeben) setzen die stimulierende Wirkung wieder herab. Weitere Versuche zeigten, daß auch die Substratoxydation durch $1 \cdot 10^{-3}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ M DNP gefördert wurde. Höhere Konzentrationen wirkten hemmend.

Danach wurde geprüft, welche DNP-Konzentration eine möglichst vollständige Hemmung der Assimilation ergibt. Sie liegt dort, wo für die Oxydation einer gegebenen Substratmenge zu CO_2 und H_2O der theoretische O_2-Verbrauch erhalten wird. Mit Methanol als Substrat (Abb. 19) betrug diese DNP-Konzentration $5 \cdot 10^{-3}$ M, denn nach Korrektur durch die endogene Atmung wurde die theoretische O_2-Menge (336 µl) erhalten. An dem fast geradlinigen Kurvenaufstieg kann man erkennen, daß kein Wachstum stattgefunden hat, während bei der Kontrollsuspension ohne DNP die leicht aufwärts gekrümmte Kurve deutliches Wachstum verrät. Durch $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M DNP wird dagegen die Assimilation nur partiell unterdrückt.

Im Gegensatz zu der Beeinflussung der Assimilation durch DNP bei der Oxydation von Methanol war es nicht möglich, einen gleichen Effekt bei der Äthanol- und Acetatoxydation zu erzielen. Es wurde auch hierbei ein erhöhter O_2-Verbrauch beobachtet (Abb. 20 u. 21), der aber nach Berücksichtigung der endogenen Atmung den der Kontrollsuspension ohne DNP nur unwesentlich übertraf. Eigenartigerweise wirkte sich DNP

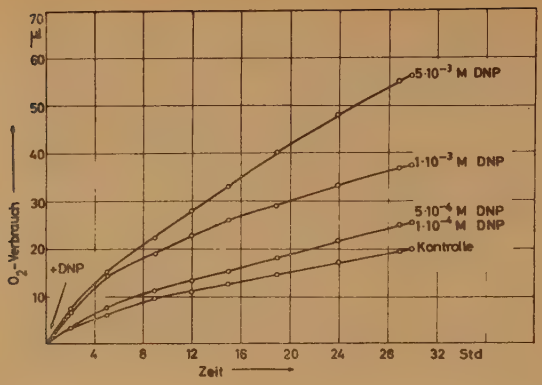


Abb. 18 Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die endogene Atmung von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,5 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 102 mg/l (Trockengewicht). Zellen mit Methanol als Substrat herangezogen. pH = 7,5; Temp.: 30°C. Für die DNP-Konzentration $1 \cdot 10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-4}$ M wurde nur eine gemeinsame Kurve gezeichnet, da die Werte fast übereinstimmten. Kontrollkurve (ohne DNP): Mittelwerte aus 2 Gefäßen.

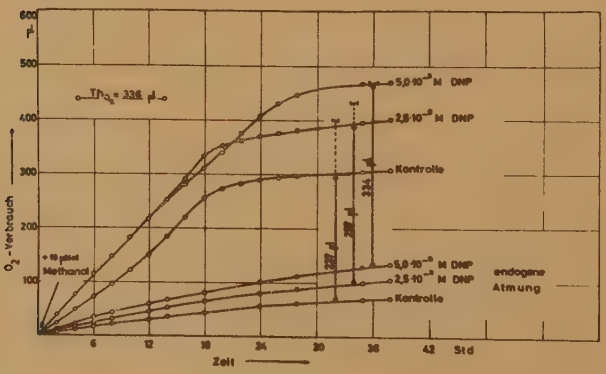


Abb. 19 Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Methanoloxydation durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 134 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 2,12 mMol/l. pH = 7,5; Temp.30°C.

Th_{O_2} = theoretischer O_2-Verbrauch

⊢ Th_{O_2} + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen Th_{O_2} + endogene Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch.

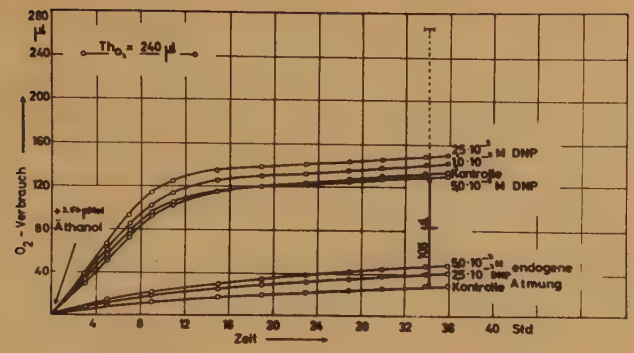


Abb. 20 Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Äthanoloxydation durch Hyphomicrobium vulgare. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 138 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 0,76 mMol/l. pH = 7,5; Temp. 30°C.

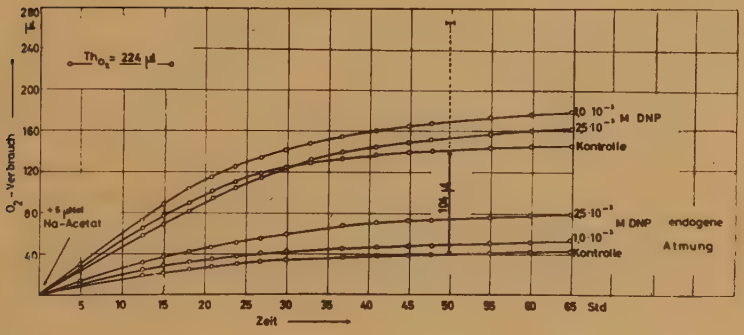


Abb. 21 Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Acetatoxydation durch Hyphomicrobium vulgare. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 110 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 1,1 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C.

ThO_2 = theoret. O_2-Verbrauch

⊢ ThO_2 + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen ThO_2 + endogene Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch.

nicht wie beim Methanolabbau gleichsinnig fördernd auf endogene Atmung und Substratoxydation aus. Während $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M die Acetatoxydation (Abb. 21), wie aus dem Vergleich mit der $1 \cdot 10^{-3}$ M DNP-Kurve ersichtlich, im ersten Kurvenabschnitt bis etwa 30 St. hemmend beeinflußt, fördert diese Konzentration die endogene Atmung am stärksten. Die gleiche Beobachtung konnte bei der Äthanoloxydation mit der etwashöheren Konzentration von $5{,}0 \cdot 10^{-3}$ M DNP im ersten Kurventeil bis etwa 12 St. gemacht werden. (Abb. 20). Bei der Äthanol- und Acetatoxydation bewirkten DNP-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-4}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M nur eine geringgradige Erhöhung des O_2-Gesamtverbrauchs.

Ammoniumsalze können die DNP-Wirkung verstärken, die nicht allein auf Änderung des pH-Wertes zurückzuführen ist. (S i m o n 1953). Vielleicht beruht dieser Effekt auf Permeabilitätsänderung. Man könnte daher versuchen, ob mit NH_4^+ der O_2-Verbrauch bei der Äthanol- bzw. Acetatoxydation bis zur Erlangung der theoretischen O_2-Menge gesteigert werden kann.

b) Natriumazid (NaN_3)

Die Versuchsergebnisse mit NaN_3 als Hemmstoff stimmten mit denen der DNP-Einwirkung gut überein. Auch durch NaN_3 ließ sich die endogene Atmung, wenn auch nicht so ausgeprägt, beschleunigen (Abb. 22). In den gewählten Konzentrationsgemischen wurde der O_2-Verbrauch durch $1 \cdot 10^{-2}$ M am stärksten erhöht. Nach 15-stündiger Versuchsdauer betrug der Unterschied gegenüber der Kontrolle etwa 30%. Daß diese Konzentration noch stimulierend wirkte, hängt sicherlich mit der großen Zelldichte von 475 mg/l zusammen, da die gleiche NaN_3-Konzentration bei geringerer Zelldichte in anderen Versuchen die endogene Atmung hemmte.

Mit $5{,}0 \cdot 10^{-3}$ M NaN_3 wurde unter Berücksichtigung der endogenen Atmung für die Methanoloxydation (Abb. 23) fast der errechnete O_2-Verbrauch erreicht. Eine gleiche Beeinflussung der Oxydation von Äthanol und Acetat (Abb. 24 und 25) konnte nicht erzielt werden. Für die Oxydation dieser beiden Substrate wurden die höchsten O_2-Werte mit $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ M NaN_3 erhalten. Bei der Einwirkung von $5{,}0 \cdot 10^{-3}$ M wurde, ähnlich wie bei DNP, die Stimulation des O_2-Verbrauches durch einen Hemmungsprozeß

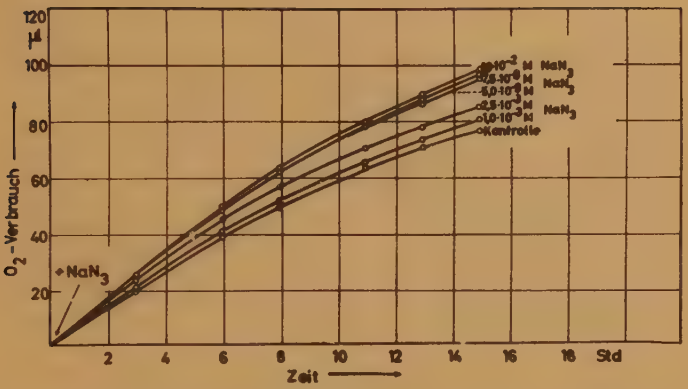


Abb. 22 Wirkung von Natriumazid (NaN_3) auf die endogene Atmung von Hyphomicrobium vulgare. 4,5 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration 475 mg/l (Trockengewicht). Zellen mit Methanol als Substrat herangezogen. pH = 7,5; Temp. 30°C.

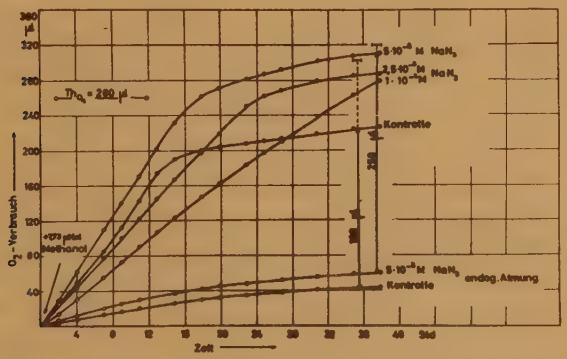


Abb. 23 Wirkung von Natriumazid (NaN_3) auf die Methanoloxydation durch Hyphomicrobium vulgare. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration 141 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 1,64 mMol/l. pH = 7,5; Temp. 30°C.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

⊢ Höhe des Th_{O_2} + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen Th_{O_2} + endogene Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch.

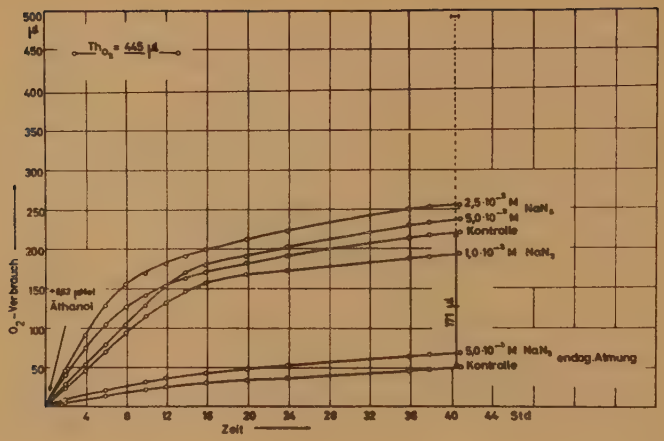


Abb. 24 Wirkung von NaN_3 auf die Äthanoloxydation durch Hyphomicrobium vulgare. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 152 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 1,41 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C.

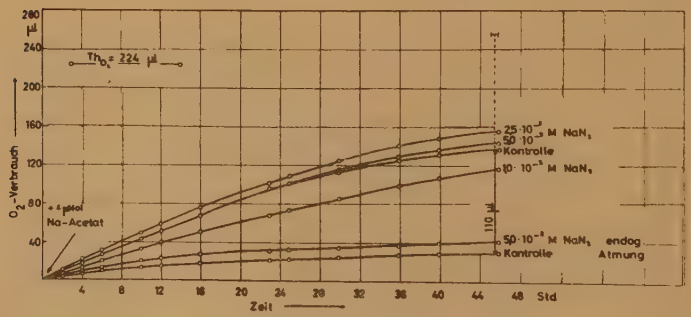


Abb. 25 Wirkung von NaN_3 auf die Acetatoxydation durch Hyphomicrobium vulgare. 4,7 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration 93 mg/l (Trockengewicht). Substratkonzentration: 1,1 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C.

Th_{O_2} = theoret. O_2-Verbrauch

⊢ Höhe des theoret. Sauerstoffverbrauchs + endogene Atmung

Gestrichelte Linie: Differenz zwischen Th_{O_2} + endogene Atmung und gemessenem O_2-Verbrauch.

überdeckt. NaN_3 in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ M hemmte die Oxydation aller drei Substrate (Abb. 23-25).

c) Kaliumcyanid (KCN)

Da aus KCN-haltigen Lösungen durch CO_2 Blausäure verstärkt in Freiheit gesetzt wird und diese den Hemmungsprozeß einleitet, wurde das KCN gleich nach dem Einhängen der Warburg-Gefäße ins Wasserbad aus dem Seitenansatz in die Suspension gegeben. KCN wirkte auf die Oxydation aller drei Substrate und setzte schon in sehr geringer Konzentration den O_2-Verbrauch beträchtlich herab, ein Hinweis auf Beteiligung schwermetallhaltiger Enzyme. So wurde bereits durch $5 \cdot 10^{-5}$ M KCN die Substratoxydation so gehemmt, daß die je Zeiteinheit aufgenommenen O_2-Mengen nur wenig größer als die der endogenen Atmung waren (Abb. 26-28). Die nächst höhere KCN-Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M ließ die O_2-Aufnahme weiter absinken, so daß sie sogar niedriger als die der Restatmung war. Die nicht vollständige Unterdrückung der Respiration durch KCN deutet auf das Vorkommen auch eines CN-unempfindlichen Enzyms hin, vermutlich des gelben Fermentes. Bemerkenswert ist ferner, daß sich die Cyanidhemmung relativ am stärksten auf die Methanoloxydation auswirkte, verglichen mit der Kontrolle, am wenigsten auf die Acetatoxydation, während Äthanol eine mittlere Stellung einnahm. Das mag damit zusammenhängen, daß Acetat an sich schon sehr langsam oxydiert wurde.

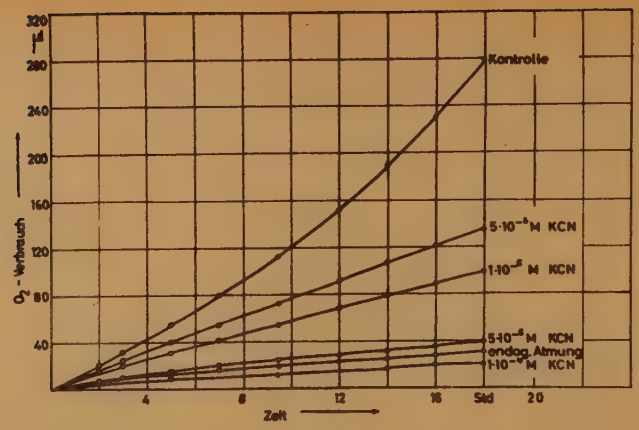
12. Hemmstoffe des Tricarbonsäurecyclus

a) Natriumfluoressigsäure

Wie die Versuchsergebnisse mit Natriumfluoressigsäure, dem spezifischen Hemmstoff der Aconitase, zeigten, erfolgte eine deutliche Beeinträchtigung der O_2-Aufnahme erst bei so hohen Konzentrationen, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine spezifische Hemmwirkung nicht vorzuliegen schien.

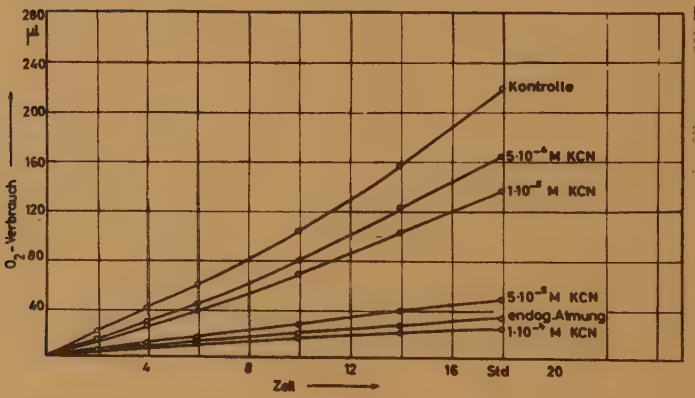
b) Natriumarsenit

Natriumarsenit greift dadurch in den Tricarbonsäurecyclus ein, daß es die oxydative Decarboxylierung von α-Ketosäuren unterbindet, wie es von K r e b s u. Mitarb. (1933a, 1933b,



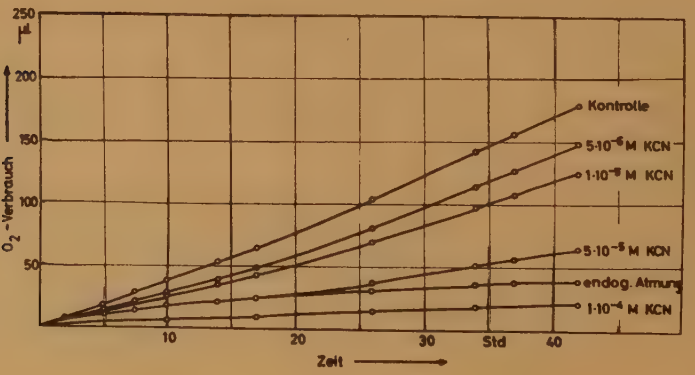
(1) Methanoloxydation

Abb.26



(2) Äthanoloxydation

Abb.27



(3) Acetatoxydation

Abb.28

Wirkung von Kaliumcyanid (KCN) auf die Substratoxydation durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,5 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 126 mg/l (1), 118 mg/l (2) bzw. 82 mg/l (3) (Trockengewicht). Substratkonzentration: 10 mMol/l. pH = 7,5; Temp.: 30°C.

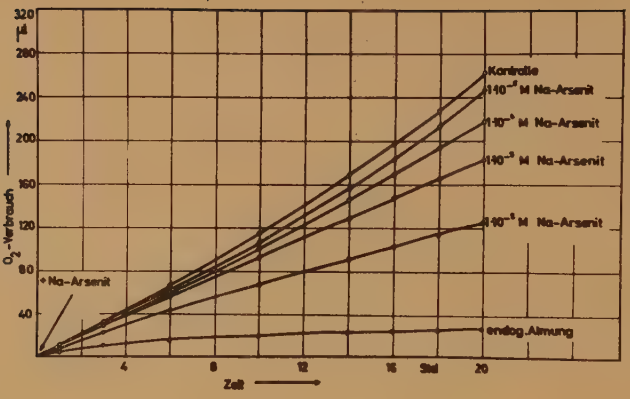
1937) nachgewiesen wurde. Der gestörte Stoffwechselablauf kann eine Anhäufung von Säuren und eine verminderte CO_2-Abgabe zur Folge haben (C h u g h t a i und W a l k e r 1951).

Von den verwendeten Hemmstoffen des Tricarbonsäurecyclus beeinflußte Natriumarsenit die Substratoxydation durch H. v u l g a r e am stärksten. Ein deutlicher Hemmeffekt ließ sich schon durch $1 \cdot 10^{-4}$ M Na-Arsenit erreichen. Die Kurve des O_2-Verbrauchs war bei der Methanoloxydation leicht aufwärts gekrümmt als Zeichen einer fortgesetzten Assimilationstätigkeit. Eine solche war an der Kurve der Äthanoloxydation nicht erkennbar, während die leicht abwärts geneigte Kurve beim Acetatabbau auf beginnende Zellschädigung hindeutet. Auch die höheren Konzentrationen wirkten sich auf die Oxydation von Acetat viel deutlicher hemmend aus als auf die von Methanol und Äthanol (Abb. 29-31).

c) Malonat und Diaethylmalonat

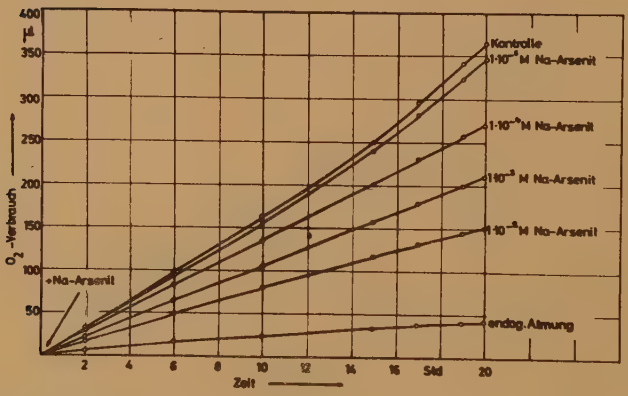
Der charakteristische Hemmstoff der Bernsteinsäure-Dehydrogenase, Malonat, wurde in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ und $1 \cdot 10^{-2}$ M bei einem pH-Wert von 7,5 geprüft. In keinem Fall konnte eine Beeinflussung der O_2-Aufnahme nachgewiesen werden. Dieses ist sicherlich dadurch zu erklären, daß bei dem angewendeten pH-Wert das Malonat nicht die plasmatischen Grenzschichten zu passieren vermochte. Wie sehr der pH-Wert die Wirksamkeit von Malonat verändert, geht aus vielen Angaben der Literatur hervor. So konnten z.B. B a r r o n u. Mitarb. (1950) die Acetatoxydation durch C o r y n e b a c t e r i u m c r e a t i n o v o r a n s bei 7,0 überhaupt nicht beeinflussen. Bei pH 5,3 wurde durch $4 \cdot 10^{-2}$ M Malonat die Oxydation dagegen völlig unterdrückt.

Da die Anwendung niedriger pH-Werte bei H. v u l g a r e nicht möglich ist, wurde Malonat in Form seines Diaethylesters gegeben. Es ist bekannt, daß Verbindungen in Esterform viel leichter innerhalb eines großen pH-Bereiches die plasmatischen Grenzschichten durchdringen und in der Zelle unabgebaut oder nach Hydrolyse zur Wirkung gelangen.



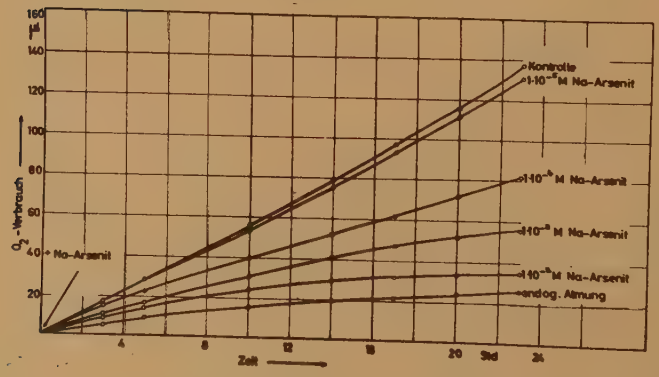
(1) Methanol-oxydation

Abb.29



(2) Äthanol-oxydation

Abb.30



(3) Acetat-oxydation

Abb.31

Wirkung von Natriumarsenit auf die Substratoxydation durch H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e . 4,5 ml Zellsuspension in NO_3-haltiger mineralischer Lösung. Zellkonzentration: 102 mg/l (1), 196 mg/l (2) bzw. 92 mg/l (3) (Trockengewicht). Substratkonzentration: 10 mMol/l

Die Versuche mit Diaethylmalonat verliefen jedoch erfolglos, da durch die rasche Hydrolyse des Esters der pH-Wert abfiel und außerdem der entstandene Äthylalkohol oxydiert wurde.

13. Assimilation von C^{14} aus markiertem Acetat, Formiat und CO_2

Die Versuche über die oxydative Assimilation hatten gezeigt, daß die Hälfte der verabfolgten Acetatmenge zu CO_2 und H_2O oxydiert wird. Die andere Hälfte mußte assimiliert worden sein, sei es in unverändertem Zustand oder nach Umbau. Um über diese offensichtliche Heterotrophie weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, war es wichtig zu erfahren, in welchem Ausmaße CO_2 neben dem Substrat in die Assimilation einbezogen wird. Die manometrischen Versuche ließen erkennen, daß bei niedrigem CO_2-Partialdruck die Acetatoxydation stark reduziert ist. Offensichtlich benötigen die Zellen für ihre synthetischen Reaktionen reichlich CO_2.

Bietet man den Zellen in äquimolarer Menge C^{14}-markiertes Acetat und CO_2 an, müßte es möglich sein, quantitative Zusammenhänge zwischen der Assimilation der beiden C-Quellen aufzufinden. Zu diesem Zweck erhielten die Suspensionen eines jeden Reaktionsgefäßes je 20 µMol Na-Acetat und $NaHCO_3$, von denen entweder das eine markiert, das andere inaktiv war oder aber beide markiert waren. Die Radioaktivität betrug für jede Verbindung 25 µC, so daß maximal 50 µC zugesetzt wurden. Die Versuche wurden mit der üblichen Warburg-Technik bei 30°C durchgeführt und nach 3 St. abgebrochen. Da eine dichte Zellsuspension verwandt wurde, erschien diese Zeit für den Einbau einer messbaren Menge C^{14} ausreichend.

Auch wurde mit C_1- und C_2-markiertem Acetat gearbeitet. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, in welchem Mengenverhältnis Methyl-C und Carboxyl-C assimiliert werden.

Die Auswertung der beobachteten Impulszahlen wird allerdings eingeschränkt durch eine Reihe von Fehlerquellen. So z.B. entstehen aus dem markierten Acetat bei dessen Oxydation C^{14}-markiertes und inaktives CO_2. Diese beiden können zur

Assimilation verwandt werden und erniedrigen somit den eingebauten Anteil von dargebotenem $C^{14}O_2$. Das dem Acetat entstammende und assimilierte $C^{14}O_2$ täuscht außerdem eine Erhöhung der Assimilation von Substrat-C^{14} vor. Da aber die Acetatoxydation durch H. v u l g a r e nur verhältnismäßig langsam verläuft, dürften sich alle diese Fehlerquellen bei kurzfristigen Versuchen nicht allzu stark bemerkbar machen.

Bezogen auf die relative spezifische Radioaktivität der Zellen, die sowohl Acetat als auch CO_2 in markierter Form erhalten haben (Tab. 9), liegen die Impulszahlen für den Einbau von $C^{14}O_2$ sehr niedrig. Sie betragen 8-9%. Danach scheint von H y p h o m i c r o b i u m in Gegenwart von Acetat nur wenig CO_2 fixiert zu werden. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die so ermittelten Werte wegen des Einbaus von Substrat-CO_2 zu niedrig ausfallen. Sie sind Mindestwerte.

Vergleicht man die Radioaktivität der Zellen, nachdem sie methyl- oder carboxylmarkiertes Acetat verarbeitet haben, so fällt ein beträchtlicher Unterschied auf. Die relative spezifische Radioaktivität der Zellen, die methylmarkiertes Acetat erhielten, ist 1,5 mal so groß wie die der Zellen, die carboxylmarkiertes Acetat bekommen haben. Dieser Unterschied ist unter der Voraussetzung, daß Acetat in den Citronensäurecyclus eingeschleust wird, begreiflich. Bei Anwendung von 1-C^{14}-Acetat müßte C^{14} vornehmlich in den beiden endständigen Carboxyl-Gruppen enthalten sein, wie G o l d s c h m i d t , Y a l l und K o f f l e r (1956) bei Penicillium chrysogenum fanden. Bei der oxydativen Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure wird dann die Hälfte davon wieder entfernt. Wird dagegen in der CH_3-Gruppe markiertes Acetat geboten, so wird das aufgenommene C^{14} nicht durch Decarboxylierungen entfernt, d.h. die Radioaktivität der Zellen ist größer als im Falle der Markierung in der COOH-Gruppe. In ähnlicher Weise ließe sich der geringere C-Einbau durch Carboxyl-C^{14} bei Vorliegen des Dicarbonsäurecyclus erklären. Zusammen mit den in Abschnitt 8 geschilderten quantitativen Befunden der Assimilation sprechen die Ergebnisse der Versuche mit markierten C-Verbindungen für ein starkes Vorwiegen der heterotrophen C-Assimilation bei Anbieten von Acetat.

Einbau von C^{14} aus Acetat und CO_2

Tab. 9

je 20 µ Mol	Radioaktivität	relative spezifische Radioaktivität der Zellen durch Einbau von C^{14} Impulse/min. Versuch 1	Versuch 2
$C^{14}H_3COONa$ $NaHCO_3$	25 µC	2234	1827
CH_3COONa $NaHC^{14}O_3$	25 µC	153	134
$C^{14}H_3COONa$ $NaHC^{14}O_3$	25 µC 25 µC	2319	1908
$CH_3C^{14}OONa$ $NaHCO_3$	25 µC	1563	1162
$CH_3C^{14}OONa$ $NaHC^{14}O_3$	25 µC 25 µC	1758	1317

Einbau von C^{14} aus Formiat und CO_2

Tab. 10

je 20 µ Mol	Radioaktivität	relative spezifische Radioaktivität der Zellen durch Einbau von C^{14} Impulse/min. Versuch 1	Versuch 2
$HC^{14}OONa$ $NaHCO_3$	25 µC	2436	2763
$HCOONa$ $NaHC^{14}O_3$	25 µC	896	1026
$HC^{14}OONa$ $NaHC^{14}O_3$	25 µC 25 µC	3246	3516

Da Verbindungen wie Methanol und Formiat von H y p h o m i c r o b i u m sehr leicht zu CO_2 und H_2O oxydiert werden, erschien es nicht ausgeschlossen, daß ein größerer Anteil von CO_2-C eingebaut wird, als es bei Acetat der Fall ist. Für die Beurteilung der hierbei beobachteten Impulszahlen (Tab. 10) gelten naturgemäß die gleichen Einschränkungen, wie sie bei den Versuchen mit Acetat angegeben sind. Die Durchführung der Versuche erfolgte, wie bei der Acetatoxydation beschrieben. Als Substrat wurde der Suspension C^{14}-markiertes Formiat neben CO_2 zugesetzt. Die Versuchsdauer war 2 St.

Innerhalb dieser Zeit war der aus CO_2 stammende Anteil des aufgenommenen C tatsächlich größer als bei Acetat + CO_2. Von der Gesamtradioaktivität (Formiat + CO_2, beide markiert) stammten etwa 28% aus dem CO_2-C und 72% aus dem Formiat-C. Auch hierbei ist zu beachten, daß es sich bei den 28% um einen Mindestwert handelt.

Um zu prüfen, ob der Kohlenstoff der verabfolgten markierten Substanzen wirklich in das Zellmaterial eingebaut wird, wurden Zell-Hydrolysate hergestellt und deren Aminosäuren papierchromatographisch getrennt. Diese wurden radioautographisch zur Darstellung gebracht. Es wurden die gleichen Aminosäuren festgestellt, die M e v i u s jr. (1953) und N ä v e k e (1957) in ihren Zell-Hydrolysaten von H. v u l g a r e gefunden hatten.

D. Schlußbetrachtungen

Mikroorganismen, die allein CO_2 als Ausgangsstoff zum Zellaufbau verwenden, die Energie zu dieser Synthese jedoch der Oxydation organischer Substanz entnehmen, könnte man als partiell chemo-autotroph bezeichnen. Substrate dieses Stoffwechseltyps könnten insbesondere solche C-Verbindungen sein, die leicht zu CO_2 und H_2O abgebaut werden wie z.B. Oxalat, Methanol, Formaldehyd, Formiat und Methan. (J a k o b y und B h a t 1958; K a n e d a und R o x b u r g h 1959; L e a d b e t t e r und F o s t e r 1958 u.a.).

Bisher ist es aber in keinem Fall gelungen, den exakten

Nachweis für die Existenz dieses Stoffwechseltyps zu erbringen. Die Radiocarbon-Methode kann hierüber wegen des bei der Substratoxydation gebildeten CO_2 keinen definitiven Aufschluß geben. Sie hat zwar erneut bewiesen, daß H y p h o m i c r o b i u m mit Formiat als Energiequelle beträchtliche CO_2-Mengen assimiliert. Daß aber Ameisensäure als solche nicht eingebaut wird, ist mit der C^{14}-Methode nicht zu entscheiden.

Sowohl in photo- als auch in chemo-autotrophen Mikroorganismen scheint die CO_2-Fixierung nach einem einheitlichen Prinzip durch Carboxylierung von Ribulose-Diphosphat unter Beteiligung des Enzyms Carboxydismutase vorzugehen. Sollte es gelingen, dieses Enzym auch bei H y p h o m i c r o b i u m nachzuweisen, wenn es C_1-Körper oxydiert, wäre das ein wichtiges Argument für den chemo-autotrophen Charakter dieses Vorganges. Daß Mikroorganismen, die C_1-Verbindungen als Energie- und C-Quelle verwerten, über ein derartiges Enzymsystem verfügen müssen, läßt sich aus den Versuchen von Q u a y l e und K e e c h (1958) ableiten, denen zufolge P s e u d o m o n a s o x a l a t i c u s bei Zusatz von Ribulose-Diphosphat Formiat-C und CO_2-C verstärkt assimiliert.

Das Verhalten von H y p h o m i c r o b i u m bei den Warburg-Versuchen mit Äthanol und Acetat sowie bei den Radiocarbon-Versuchen weist ohne Zweifel auf eine heterotrophe Lebensweise hin, wenn C_2-Körper als Substrate dienen. Dadurch wird die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß C_1-Verbindungen nach Art der Chemo-Autotrophie verwertet werden in Analogie zu den fakultativ chemo-autotrophen Mikroorganismen.

Der Einbau von CO_2 in Gegenwart von Formiat ist zwar erheblich, aber er kann nur als Hinweis für eine Autotrophie gewertet werden. Vielleicht lassen sich überzeugendere Argumente bei Anwendung von deuteriertem Formiat herbeiführen. Auch die Identifizierung der ersten faßbaren Intermediärprodukte der Formiatassimilation könnten von Nutzen sein.

H. v u l g a r e in die Gruppe der "Pseudoautotrophen Mikroorganismen" einzuordnen, die C_1-Verbindungen mit einem geringeren Oxydationszustand als CO_2 assimilieren (K a n e -

d a und R o x b u r g h 1959), könnte daher gleichfalls erst durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Jedenfalls muß H. v u l g a r e , wie in Bergey's Manual (1957) geschehen, weiter als ein chemo-heterotropher Mikroorganismus angesehen werden.

Wie N ä v e k e (1957) fand, kann die Formiatoxydation durch H. v u l g a r e durch eine geeignete DNP-Konzentration so gelenkt werden, daß die Assimilation unterbunden ist. Das trifft auch für die Methanoloxydation zu. Die Reaktionen laufen dann offenbar nur unter der Einwirkung von Dehydrogenasen und Oxydasen ab. Der ermittelte O_2-Verbrauch entspricht daher dem theoretischen Wert bei völliger Substratoxydation. Das gleiche ließ sich mit NaN_3 erreichen. Dagegen blieb dieser Effekt bei der Äthanol- und Acetatoxydation aus. Es war zwar auch hier der O_2-Gesamtverbrauch erhöht, aber das Ausmaß der endogenen Atmung war ebenfalls etwa um den gleichen Betrag größer.

Unter der Voraussetzung, daß DNP und NaN_3 die Phosphorylierungs- und dadurch die Assimilationsvorgänge hemmen, deutet die unterschiedliche Beeinflussung der Assimilation bei der Oxydation von C_1- und C_2-Verbindungen auf eine verschiedenartige Phosphorylierung hin. Demnach müßte die Assimilation bei der Oxydation von Methanol und Formiat in hohem Grade mit der Bildung energiereicher Phosphate verknüpft sein, während die Assimilation bei der Oxydation von Äthanol und Acetat weniger mit solchen Phosphorylierungsvorgängen gekoppelt wäre. Daß der gleiche Befund bei Äthanol und Acetat erhoben wurde, ist wegen der intermediären Bildung von Acetat während der Äthanoloxydation nicht weiter verwunderlich. In Anbetracht der fundamentalen Bedeutung der aktivierten Essigsäure ist es allerdings schwer verständlich, daß der Acetatabbau durch H. v u l g a r e ohne oder nur unter geringer Beteiligung energiereicher Phosphatverbindungen vonstatten gehen sollte.

Nach L o o m i s und L i p m a n (1948), M e y e r h o f und F i a l a (1950) werden Phosphorylierungsvorgänge auf niedriger Energiestufe durch DNP kaum beeinträchtigt, während die mit Elektronentransport einhergehenden stark gehemmt werden. Dieses trifft besonders für die Bildung von ATP

und Phosphokreatin zu. Der bei H. v u l g a r e beobachtete geringe Einfluß von DNP und NaN_3 reicht aber keineswegs aus, eine ATP-unabhängige Assimilation bei der Oxydation von Äthanol und Acetat anzunehmen, da bei Verwendung intakter Zellen Hemmstoffversuche mit Unsicherheitsfaktoren behaftet sind.

Im Gegensatz zu DNP und NaN_3 beeinflußten die anderen geprüften Hemmstoffe die Oxydation von Methanol, Äthanol und Acetat in annähernd gleichem Maße. Die starke Hemmung der Substratoxydation durch KCN weist auf schwermetallhaltige Enzyme hin, vermutlich Cytochromoxydase-Cytochrom-Systeme. Na-Arsenit setzt die O_2-Aufnahme bei der Oxydation aller drei Substrate beträchtlich herab. Aussagen über die betroffenen Enzymsysteme, insbesondere die des Tricarbonsäurecyclus, sind jedoch daraus nicht abzuleiten. Erst durch den Nachweis angehäufter Intermediär- bzw. Endprodukte (z.B. Glutaminsäure) könnte dies ermöglicht werden.

Die Verwendung von NO_3^- als N-Quelle wirkte sich auf die Oxydation bestimmter Substratmengen insofern aus, als der O_2-Gesamtverbrauch und die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme niedriger waren als in Gegenwart von NH_4^+. Diese O_2-Differenz ist auf die während der Assimilation erfolgte Reduktion von NO_3^- durch Substratwasserstoff zurückzuführen. Hierdurch finden wahrscheinlich einige zu hohe RQ-Werte, die sich bei der Substratoxydation in Anwesenheit von NO_3^- ergeben haben, eine Erklärung. Es wird Substrat bis zu CO_2 dehydriert, ohne daß dazu freier O_2 benötigt wird. (Extra-CO_2 nach W a r b u r g und N e g e l e i n 1920). Die erheblich schwankenden RQ-Werte der Äthanoloxydation sind durch das intermediäre Auftreten von Acetat und dessen langsamen weiteren Abbau zu erklären.

Die Substanzen des Tricarbonsäurecyclus werden von H. v u l g a r e nicht oder nur sehr wenig angegriffen. Zusammen mit der fehlenden oder geringen Wirkung bestimmter Hemmstoffe deutet dieses auf geringe Permeabilität der plasmatischen Grenzschichten für diese Stoffe hin. Es wäre denkbar, daß manche der mit intakten Zellen nicht zu lösenden Fragen einer Klärung nähergebracht werden könnten, wenn sich

die Permeabilität erhöhen ließe oder aber Versuche mit zellfreien Extrakten und Fermentpräparaten vorgenommen würden.

E. Zusammenfassung

Es wurden Oxydation und Assimilation von Methanol, Äthanol und Acetat durch intakte Zellen von H y p h o m i c r o b i u m v u l g a r e untersucht.

Als pH-Optimum wurde für die Substratoxydation der Bereich von pH 7,0 bis 8,0 ermittelt.

Eine Erniedrigung des CO_2-Partialdruckes bewirkte eine starke Herabsetzung der Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme bei der Acetatoxydation. Die Äthanoloxydation erwies sich nur bei geringer Zelldichte als abhängig vom CO_2-Partialdruck, die Methanoloxydation blieb unbeeinflußbar, wahrscheinlich wegen des raschen Abbaus von Methanol zu CO_2 und H_2O.

Die RQ-Werte für Methanol und Acetat entsprachen annähernd den errechneten Werten bei völliger Substratoxydation. Die RQ-Werte der Äthanoloxydation zeigten große Schwankungen, die auf einen langsamen Abbau des intermediär gebildeten Acetats zurückgeführt werden konnten.

Ruhende und wachsende Zellen ergaben in den RQ-Werten keinen wesentlichen Unterschied. Einige etwas zu hoch ausgefallene RQ-Werte wachsender Zellen beim Abbau von Methanol und Acetat ließen sich durch die Bildung von Extra-CO_2 in der NO_3^-haltigen Suspensionsflüssigkeit erklären.

Die endogene Atmung blieb ohne nennenswerten Einfluß auf die RQ-Werte.

Mit NH_4^+ als N-Quelle wurde für die Oxydation einer gegebenen Substratmenge mehr O_2 verbraucht als mit NO_3^-. Der Unterschied ist auf die Reduktion von NO_3^- durch Substratwasserstoff zurückzuführen.

Mit NH_4^+ als N-Quelle werden bei der Oxydation von Methanol etwa 80% und von Äthanol und Acetat etwa 55% der O_2-Menge verbraucht, die für eine vollständige Oxydation erforderlich gewesen wäre.

Durch Anwendung der Radiocarbonmethode ließ sich zeigen, daß etwa 8-9% CO_2 bei Acetat, dagegen 28% bei Formiat als

Substrat eingebaut wurden.

Durch Zusatz einer geeigneten Konzentration von 2,4-DNP und NaN_3 konnte beim Methanolabbau die Oxydation von der Assimilation abgetrennt werden. Die aufgenommene O_2-Menge entsprach dann dem O_2-Verbrauch bei völliger Methanoloxydation. Mit Äthanol und Acetat gelang diese Entkoppelung nicht.

Die Oxydation aller drei Substrate wurde durch KCN und Natriumarsenit beträchtlich gehemmt. Durch Malonat konnte kein Hemmeffekt erzielt werden. Die durch Natriumfluoressigsäure bewirkte Hemmung wurde nicht für spezifisch gehalten.

F. Literatur

Barron, E.S.G., M. I.Ardao, and M. Hearon: The mechanism of acetate oxidation by Corynebacterium creatinovorans. Arch. Biochem. 29,130-153 (1950) .

Bergey's Manual of determinative bacteriology, 7. Auflage (1957). The Williams & Wilkins Company,Baltimore.

Burton, K.: Free energy data of biological interest in Krebs, H.A. and H.L. Kornberg: Energy transformations in living matter. Springer-Verlag Berlin 1957.

Chughtai, M.I.D., and T.K. Walker: The mechanism of the formation of organic acids by mould fungi. 5. The influence of arsenite on Aspergillus niger. Biochem. J. 48,524-527 (1951).

Engel, H. und W. Mevius jr. : Beiträge zur Kenntnis der Hyphenstruktur von Hyphomicrobium. Ber. dtsch. bot. Ges. 64, 208 -212 (1951).

Goldschmidt, E.P., I. Yall, and H. Koffler: Biochemistry of filamentous fungi. IV. The significance of the tricarboxylic acid cycle in the oxidation of acetate by Penicillium chrysogenum. J. Bact. 72, 436-446 (1956).

Jakoby, W.B., and J.V. Bhat: Microbial metabolism of oxalic acid. Bact. Rev. 22, 75-80 (1958).

Kaneda, T., and J.M. Roxburgh: Serine as an intermediate in the assimilation of methanol by a pseudomonas. Biochim. Biophys.Acta 33, 106-110 (1959).

Kaneda, T., and J.M. Roxburgh: A methanol-utilizing bacterium. I. Description and nutritional requirements. II. Studies on the pathway of methanol assimilation. Canad. J. Microbiol.5,87-98; 187-195 (1959).

Kingma Boltjes, T.Y.: Über Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 7, 188-205 (1936).

Krebs, H.A.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 217, 191-227 (1933).

K r e b s , H.A.: Weitere Untersuchungen über den Abbau der Aminosäuren im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem. 218, 157-159 (1933).

K r e b s , H.A., and W.A. J o h n s o n : The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia 4, 148-156 (1937).

L e a d b e t t e r , E.R., and J.W. F o s t e r : Studies on some methane -utilizing bacteria. Arch. Mikrobiol. 30, 91-118 (1958).

L o o m i s , W.F. und F. L i p m a n : Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. J.Biol. Chem. 173, 807-808 (1948). Zit. nach R i t z m a n n , E.: Vergiftungen mit Dinitrophenol und Ortho-Dinitrokresol. Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 8, 381-385 (1958).

M e v i u s jr.,W.: Beiträge zur Kenntnis von Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 19, 1-29 (1953).

M e y e r h o f , O., and S. F i a l a : Biochem. Biophys. Acta 6, 1 (1950) zit. nach R i t z m a n n , E.: Vergiftungen mit Dinitrophenol und Ortho-Dinitrokresol. Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 8, 381-385 (1958).

M o m t a z El- G i n d y , M. und E. D r e w s : Erfahrungen beim papierchromatischen Nachweis einiger Konservierungsmittel in Backwaren. Brot und Gebäck 11, 224-228 (1957).

M o s e s , V.,and P.J. S y r e t t : The endogenous respiration of microorganisms. J. Bact. 70, 201-204 (1955).

N ä v e k e , R. und H. E n g e l : Der Formiatabbau durch Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch.Mikrobiol. 21, 371-375 (1955).

N ä v e k e , R.: Formiatoxydation und Kohlenstoff-Assimilation bei Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 27, 375-399 (1957).

Quayle, J.R., and D.B. Keech: Carbon dioxide and formate utilization by formate-grown Pseudomonas oxalaticus. Biochim. Biophys. Acta 29, 223-225 (1958).

Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1956).

Simon, E. W.: Mechanisms of dinitrophenol toxicity. Biol. rev. Cambridge phil. Soc. 28, 453-479 (1953).

van Slyke, D. D. und J. Folch: Manometric carbon determination. J. biol. Chem. 136, 509-541 (1940).

Stutzer, A. und R. Hartleb: Der Salpeterpilz. Zbl. Bakt. II 3, 6-9; 54-57; 161-177; 235-245; 311-321; 351-354 (1897).

Warburg, O. und E. Negelein: Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. Biochem. Z. 110, 66-115 (1920).

Lebenslauf

Am 26. VII. 1918 wurde ich als Sohn des Apothekers Wilhelm Kaffka und seiner Ehefrau Mathilde geb. Sunkel in Ostercappeln (Bez. Osnabrück) geboren. Von 1929 bis zur Reifeprüfung 1937 besuchte ich das Realgymnasium in Osnabrück. Nach einem Studium von 10 Semestern legte ich 1944 das medizinische Staatsexamen an der Universität Hamburg ab und promovierte im gleichen Jahr an der Medizinischen Fakultät. Nach dem pharmazeutischen Vorexamen 1948 studierte ich an der Universität Hamburg Pharmazie und legte nach 6 Semestern das pharmazeutische Staatsexamen ab. Meine Ausbildung in der medizinischen Bakteriologie, Serologie und Mykologie erhielt ich im Hygienischen Institut Hamburg, wo ich in der Medizinaluntersuchungsanstalt als Wissenschaftlicher Angestellter tätig bin.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Engel (Leiter der Abteilung für Mikrobiologie des Staatsinstituts für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg) in der Zeit von April 1956 bis Dezember 1959 durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die Förderung dieser Arbeit und für wertvolle Anregungen sei meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Engel, vielmals gedankt.

Herrn Prof. Dr. W. Mevius, Direktor des Staatsinstituts für Allgemeine Botanik, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit.